

Maria Antonia Monteiro Palone

**Análise das fibras musculares do músculo sóleo de rato após
reconstrução nervosa periférica: efeito da associação do selante
heterólogo de fibrina à sutura**

Orientadora: Prof^a Dr^a Selma Maria Michelin Matheus

Botucatu, SP

2021

Maria Antonia Monteiro Palone

**Análise das fibras musculares do músculo sóleo de rato após
reconstrução nervosa periférica: efeito da associação do
selante heterólogo de fibrina à sutura**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Selma Maria Michelin Matheus

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Setor de Anatomia,
Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

Botucatu, SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Palone, Maria Antonia Monteiro.

Análise das fibras musculares do músculo sóleo de rato após reconstrução nervosa periférica : efeito da associação do selante heterólogo de fibrina à sutura / Maria Antonia Monteiro Palone. - Botucatu, 2021

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Selma Maria Michelin Matheus

Capes: 20604009

1. Músculo esquelético. 2. Nervos Periféricos - Doenças. 3. Biopolímeros. 4. Fibrina. 5. Adesivo tecidual de fibrina.

Palavras-chave: Biopolímero heterólogo de fibrina (CEVAP); Interação neuromuscular; Lesão nervosa periférica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha avó, Maria Carlota Chaves Monteiro, por sempre ter acreditado em mim. Vó, eu dedico todas as minhas conquistas à sua memória.

À minha família — meu pai, Kleber, minha mãe, Luciane e minha irmã, Maria Eduarda — por todos os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse estar aqui.

Aos meus tios — Vanderlei, Alessandra e Mariana —, por estarem sempre por perto e por me apoiarem e me incentivarem desde o começo.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Selma Maria Michelin Matheus, por estar sempre à disposição para me ajudar e por ter tido uma paciência interminável com meus atrasos.

Aos colegas e técnicos de laboratório, em especial o Felipe, a Ana e o Gelson, por me ensinarem tanto sobre os procedimentos a serem realizados.

Aos meus amigos da “*Geoaliança*”. Arthur, Bruno, Giovanna, Gustavo, Marcio e Matheus, vocês foram a melhor parte desses cinco anos.

Aos meus professores da graduação, que tanto me mostraram sobre a Biologia.

E, finalmente, a todos que participaram direta ou indiretamente da minha formação. Muito obrigada!

Sumário

RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
RESULTADOS.....	16
DISCUSSÃO.....	22
CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMO

Os nervos são os principais constituintes do Sistema Nervoso Periférico, com frequência, são acometidos por lesões cujas causas mais comuns são: traumas, estiramento, pinçamento, compressão e esmagamento. As lesões nervosas periféricas (LNPs) levam à interrupção da condução nervosa e afetam, além do nervo, o músculo. Ocorrem diversas alterações estruturais, funcionais e moleculares; além de atrofia. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas a recuperação após este tipo de lesão raramente é completa. Métodos alternativos de reconstrução vêm sendo utilizados, entre eles o selante heterólogo de fibrina. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da associação do selante heterólogo de fibrina à sutura na reconstrução nervosa com foco nas fibras musculares, aos 7 e 30 dias após lesão do nervo isquiático. Foram utilizados 40 ratos Wistar machos adultos, divididos em 4 grupos experimentais: Controle Sham (CS); Controle Desnervado (CD); Lesão + Sutura (LS); Lesão + Sutura + Biopolímero de Fibrina (LSB). No grupo CS foi realizada apenas incisão superficial no antímero direito com localização do nervo isquiático. No grupo CD foi realizada neurotmeze do nervo isquiático (*gap* de 6 mm). No grupo LS após neurotmeze os cotos foram religados com 2 pontos de sutura. No grupo LSB, a reconstrução foi realizada por 2 pontos de sutura seguida da aplicação do biopolímero. Decorridos 30 dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Os músculos sóleos direitos foram coletados para a realização da análise morfológica (HE) e morfométrica das fibras musculares (área, perímetro, diâmetros máximo e mínimo, angulação, circularidade e contagem de núcleos centrais). Aos 7 dias não houve diferença morfológica entre os grupos, em relação à morfometria o grupo CS apresentou maior valor de diâmetro mínimo quando comparado aos demais (CD, LS, LSB). Já aos 30 dias, o grupo CD apresentou aglomerados de pequenas fibras musculares, algumas delas com núcleo central. A morfometria, não mostrou diferenças em relação à angulação e circularidade da fibra muscular. Já os valores de área, diâmetro mínimo e diâmetro máximo foram maiores no grupo Controle Sham (CS) quando comparados aos demais (CD, LS, LSB). O número de núcleos centrais foi maior no grupo CD quando comparado aos grupos CS e LSB. Destaca-se o número de núcleos centrais do grupo LSB semelhante ao grupo CS e diferente do grupo CD. Os resultados mostram-se promissores, mas são necessários mais estudos para indicar a redução ou substituição das suturas como tratamento para LNPs.

INTRODUÇÃO

O corpo humano é um organismo extremamente complexo. Suas capacidades mecânicas — como estabilidade, movimentos voluntários e resistência a ferimentos — devem-se à rede interconectada de músculos estriados esqueléticos controlada pelo sistema nervoso, que pode chegar a até 40% da massa corporal de um adulto (JANSSEN *et al.*, 1985; MURPHY *et al.*, 2018).

O tecido muscular esquelético é composto por várias fibras musculares, que consistem em células especializadas individuais, com núcleos múltiplos localizados na periferia e formato alongado, de diâmetro entre 10 e 100µm e comprimento entre 1 e 50cm (NEUMANN, 2009).

Segundo Junqueira e Carneiro (2009), as fibras musculares esqueléticas estão organizadas em conjuntos de feixes envolvidos por uma camada de tecido conjuntivo chamada epimísio. Do epimísio em direção ao interior do músculo, partem septos de tecido conjuntivo (perimísio) que separam os feixes e cada fibra muscular é individualmente envolvida pelo endomísio, formado pela lâmina basal da fibra associada a fibras reticulares.

Esse tecido conjuntivo é muito importante, pois além de permitir que a força de contração gerada por cada fibra atue no músculo inteiro e seja transmitida à outras estruturas como tendões e ossos, também é nele em que estão redes de vasos sanguíneos, os vasos linfáticos e os nervos periféricos motores e sensitivos, responsáveis respectivamente pela contração muscular e pela captação de sensações advindas do ambiente externo ao corpo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2009; NEUMANN, 2009).

Os músculos estriados esqueléticos são inervados por nervos periféricos, que são essenciais para a manutenção da massa muscular e também para o controle dos movimentos.

Nervos periféricos são estruturas naturalmente frágeis que podem ser facilmente danificadas por compressão ou por traumas (HUSSAIN *et al.*, 2020). Essas lesões nervosas periféricas (LNPs) comprometem as funções motoras e sensoriais devido à interrupção da transmissão correta dos impulsos nervosos e possuem uma ampla variedade de sintomas, que vão desde desconforto leve causado por formigamento, à debilitações que podem persistir para a vida toda, como perda de movimento e sensibilidade, dependendo da gravidade e dos nervos envolvidos (STAFFORD, *et al.*, 2007; MENORCA *et al.*, 2015).

De acordo com o National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) dos Estados Unidos, a maioria das neuropatias periféricas é causada

por trauma físico decorrente de acidentes automobilísticos, quedas, prática de esportes e procedimentos médicos. Porém, as LNP também podem estar relacionadas a outros fatores como doenças autoimunes, problemas vasculares, infecções e diabetes, o que as torna extremamente comuns.

No entanto, embora essas lesões afetem uma parcela considerável da população, a recuperação completa e funcional do paciente ainda mostra-se um desafio pois, mesmo que os nervos sejam capazes de reinervar os músculos, sua capacidade de regeneração é superada pelos efeitos degradantes no tecido muscular (ASPLUND, *et al.* 2009; LANGER, *et al.*, 2018; GORDON, 2020).

Pela classificação de Seddon (1943), há três categorias de lesão nervosa, baseadas na presença de desmielinização e na gravidade do dano causado nos axônios e no tecido conjuntivo. A mais leve chama-se neuropraxia e é caracterizada por desmielinização focada, sem dano ao axônio ou ao TC. Normalmente, causa diminuição na velocidade de condução do impulso nervoso e pode levar à fraqueza muscular. A lesão média é a axonotmese, que consiste em dano direto ao axônio, além de desmielinização focada, mas mantém intacta a continuidade do TC. A mais grave das lesões é a neurotmese, em que ocorre transecção completa do axônio e do TC, interrompendo a continuidade do nervo.

Quando os neurônios motores são desligados de suas fibras musculares por LNP, eles frequentemente se regeneram e se reconectam com as fibras musculares. Os axônios em regeneração, normalmente, seguem os tubos endoneurais ("tubos das células de Schwann") que anteriormente ocupavam (NGUYEN; SANES & LICHTMAN, 2002). Quando os axônios chegam de volta nos locais de sinapse, há frequentemente uma remodelação desses contatos. O grau dessa remodelação depende de quão rapidamente os sítios são reinervados. Reinervação rápida leva a modesta remodelação, quando os resultados são considerados de reinervação tardia, ocorrem mudanças mais profundas no local sináptico (RICH & LICHTMAN, 1989).

A atrofia muscular é um dos sintomas mais comuns após uma LNP, estando a mesma associada a uma redução da atividade muscular esquelética (TSAI *et al.*, 2016), acompanhada por um decréscimo no número de miofibrilas e células satélites (GUTMANN e ZELENKA, 1962; ANZIL e WERNIG, 1989; BORISOV e CARLSON, 2000; SCHMALBRUCH E LEWIS, 2000).

Em meio à reação inflamatória, quando há reconstrução nervosa, as células satélites são ativadas para a reconstrução muscular, construindo e fundindo miofibrilas com núcleos centrais (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). As

recém-formadas miofibrilas contam com nova inervação para completar seu processo de diferenciação e recuperação da força muscular (LIN *et al.*, 2008).

Atualmente, diversos métodos cirúrgicos e não-cirúrgicos estão disponíveis para tratar as LNPs, entre eles sutura do nervo afetado, transplante de nervos, implantes de materiais sintéticos, neurorrafia, estimulação elétrica dos nervos e selantes de fibrina. Dentre esses métodos, a sutura é o que apresenta melhores resultados, mas também mostra-se desvantajoso em alguns quesitos, pois necessita de técnicas em microcirurgia muito precisas, além de haver a possibilidade de o paciente apresentar reações ao material da sutura e processo inflamatório acentuado devido ao manuseio excessivo dos tocos nervosos (NARAKAS, 1988; ATTAR *et al.*, 2012; HUSSAIN *et al.*, 2020).

Como alternativa às suturas, os selantes de fibrina têm se mostrado muito promissores devido à baixa reação inflamatória, curto tempo de recuperação e à possibilidade de aplicação em situações de emergência em que intervenção cirúrgica não é possível. Porém, a maioria dos selantes disponíveis comercialmente utiliza sangue humano em sua composição, o que pode causar infecções, fibrose, toxicidade e necrose (HUSSAIN *et al.*, 2020).

Buscando uma alternativa mais barata e com o intuito de minimizar as reações ao fibrinogênio presente no sangue humano e à trombina bovina contida nesses selantes, o Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP - UNESP) desenvolveu um bioproduto heterólogo derivado de compostos animais (biopolímero heterólogo de fibrina - BHF), como enzimas obtidas de veneno de *Crotalus durissus* (cascavel) e crioprecipitados ricos em fibrinogênio obtidos do sangue de búfalos. Diversos estudos têm sido realizados com esse produto, entre eles testes sobre seus possíveis efeitos ao tratar LNPs (BARBOSA, *et al.*, 2010; BARBIZAM *et al.*, 2013; BISCOLA *et al.*, 2017).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos do tratamento de LNPs com o BHF em associação à sutura sobre as fibras musculares do músculo sóleo de ratos após lesão do nervo isquiático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais de Experimentação

Foram utilizados 40 ratos Wistar machos adultos, com 70 dias de vida e peso corporal médio entre 300g - 400g. Os animais foram obtidos pelo Biotério Central da UNESP de Botucatu, e foram mantidos no Biotério de Roedores 1 da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de

Botucatu - UNESP, em caixas de polietileno (medindo 40x30x15cm), com fundos sólidos forrados com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12h claro/12h escuro), temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), sendo fornecida água filtrada e ração *Presence® ad libitum* durante toda a duração do experimento. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu (CEUA-IBB: Protocolo 1177/2019).

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo os grupos: Controle Sham (CS), Controle Desnervado (CD), Lesão + Sutura (LS) e Lesão + Sutura + Biopolímero Heterólogo de Fibrina (LSB).

Para avaliar e comparar os efeitos do biopolímero sobre as fibras musculares, foram analisados dois tempos experimentais diferentes: de 7 (processos degenerativos) e de 30 dias (processos regenerativos) após lesão dos grupos experimentais.

Assim, 8 grupos foram formados:

7 dias	30 dias
Controle Sham - 7 dias (CS 7)	Controle Sham - 30 dias (CS 30)
Controle Desnervado - 7 dias (CD 7)	Controle Desnervado - 30 dias (CD 30)
Lesão Sutura - 7 dias (LS 7)	Lesão Sutura - 30 dias (LS 30)
Lesão Sutura Biopolímero Heterólogo de Fibrina - 7 dias (LSB 7)	Lesão Sutura Biopolímero Heterólogo de Fibrina - 30 dias (LSB 30)

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) por período (7 e 30 dias).

Procedimento Cirúrgico

Trinta minutos antes do procedimento cirúrgico os animais receberam de forma subcutânea a aplicação de Enrofloxacino (antibiótico na dose de 10 mg/kg), o qual foi administrado em dose única, a fim de evitar possíveis infecções advindas dele.

Inicialmente, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina (Dopalen - 90 mg/kg) e Xilazina (Anasedan - 10 mg/kg), dando sequência ao procedimento cirúrgico a seguir.

Após tricotomia do membro pélvico direito, os animais foram posicionados em decúbito ventral, mantendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução. Foi realizada a antisepsia com álcool-iodado, seguida de incisão sobre a face lateral da coxa (sendo previamente aplicado Lidocaína 7 mg/kg no local da incisão), desde a altura do trocanter maior até o joelho (Figura 1.A-B) e os nervos isquiáticos direitos foram expostos (Figura 1.C).

Nos animais dos grupos CD, LS e LSB de forma padronizada, a cerca de 3mm distal à sua emergência, foi realizada uma lesão nervosa por transecção completa do nervo (neurotmese). Nos animais do grupo CD a fim de evitar regeneração espontânea, foi removido um fragmento de 6 mm do nervo isquiático, os cotos proximais e distais foram invertidos a 180 graus e fixados na musculatura adjacente, com sutura simples utilizando fio de nylon (Mononylon 10-0, Polysuture) (Figura 1.D).

Nos grupos LS e LSB, logo após a neurotmese os cotos nervosos foram reaproximados e submetidos à microcirurgia reconstrutiva para reparo do nervo isquiático. No grupo LS os cotos foram religados através de neurorrafia término-terminal por meio de anastomose epineural com 2 pontos simples de monofilamento nylon (Mononylon 10-0, Polysuture) (Figura 1.E).

No grupo LSB, a reconstrução nervosa foi realizada por neurorrafia término-terminal (2 pontos de sutura) seguida da aplicação de 300 µL de biopolímero de fibrina (Figura 1.F), que foi gentilmente cedido pelo CEVAP, UNESP Botucatu, Brasil, cujos componentes e fórmula de aplicação constam das suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados sobre o local da lesão (Gasparotto *et al.*, 2014).

Após a realização da reconstrução, os tecidos moles foram suturados com pontos simples utilizando fio de nylon (Mononylon 5-0, Polysuture), os animais foram mantidos sob aquecimento até a recuperação e ao acordarem foi administrada solução contendo dipirona sódica via gavagem.

Nos animais do grupo CS foi apenas realizada a localização e debridaç o do nervo isquiático (Figura 1.C), sendo em seguida a pele suturada (Mononylon 5-0, Polysuture).

Nos três dias consecutivos (pós-cirúrgico), o protocolo analgésico consistiu em um antibiótico (Enrofloxacino - 10 mg/kg) e um opióide (Tramadol - 5 mg/kg), via subcutânea a cada 12 horas, e se necessário, caso ainda houvesse dor, até 5 dias.

Além disso, foi utilizado água oxigenada (peróxido de hidrogênio), Rifocina Spray (rifamicina) e PVPI (iodopovidona) no local da incisão, durante o período de cicatrização, para assepsia do mesmo.

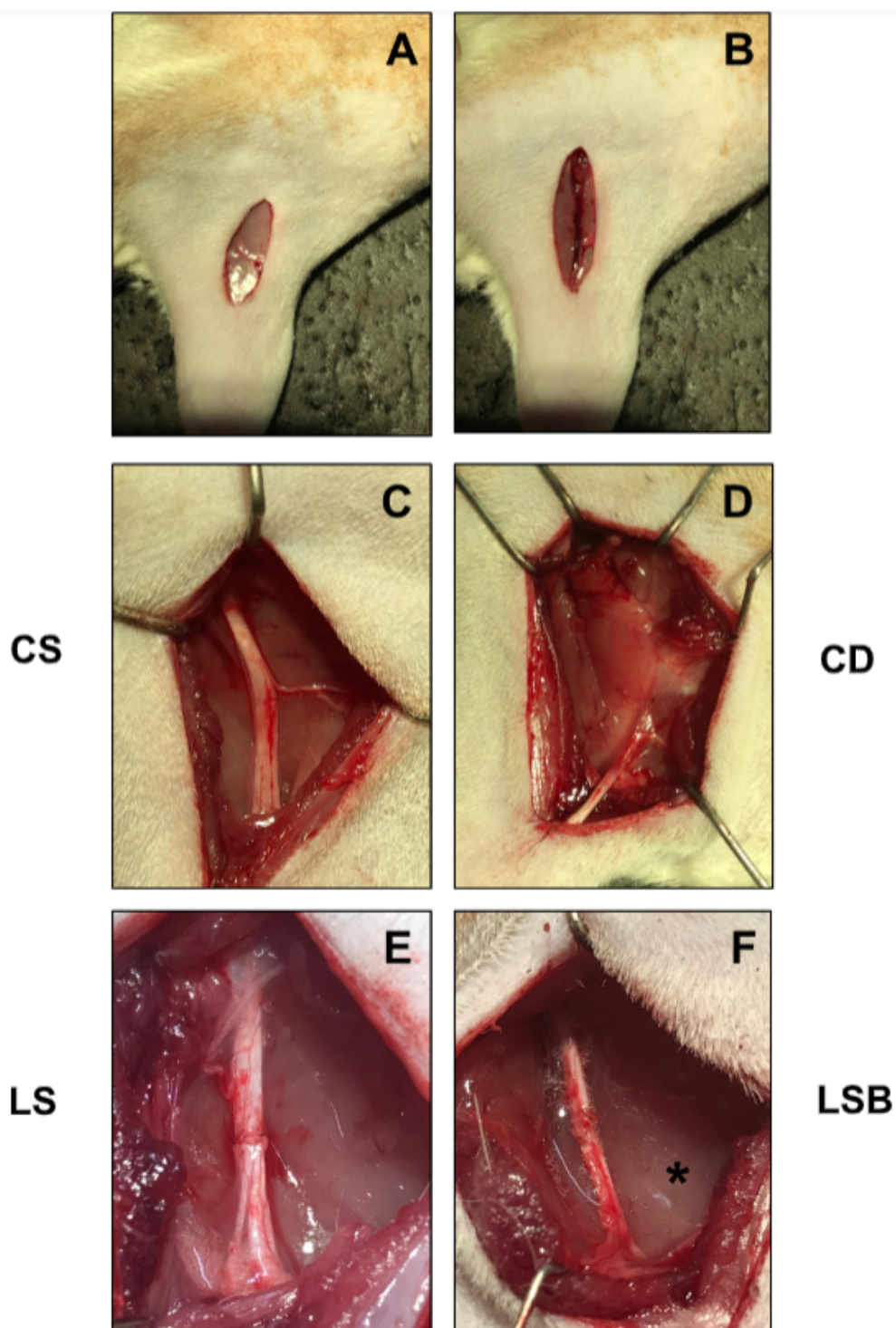


Figura 1: Fotografias das técnicas cirúrgicas utilizadas em todos os grupos experimentais. A e B - Incisão. C - Localização do nervo isquiático (CS). D - Neurotmeia e visualização dos cotos proximal e distal (CD). E - Detalhe da neurorrafia (LS). F - Detalhe da neurorrafia associada ao biopolímero de fibrina (LSB). Asterisco (*): coágulo formado pelo BHF.

Decorridos os períodos experimentais, aos 7 e 30 dias, os animais foram pesados e anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina

(Dopalen - 90 mg/kg) e Xilazina (Anasedan - 10 mg/kg), em seguida, 5 animais de cada grupo experimental foram submetidos a perfusão intracardiaca. Para isso, foi realizada tricotomia da região peitoral, as vísceras torácicas foram expostas e a perfusão se deu por meio do ventrículo esquerdo em direção à aorta, com bomba dosadora peristáltica Milan®, inicialmente com PBS 0,1M e posteriormente fixação com paraformaldeído a 4%, ambos em um fluxo de 30ml/minuto. A aurícula direita foi seccionada junto ao átrio direito para escoamento do sangue e do excedente do líquido de perfusão. Em seguida os músculos sóleos direitos foram dissecados e coletados para análise morfológica e morfométrica das fibras musculares.

Análise morfológica e morfométrica das fibras do músculo sóleo

Após coleta, as extremidades proximais e distais dos músculos sóleos foram fixadas em formol tamponado (10%), lavadas em água corrente, incluídas em *Paraplast*® e seccionadas em micrótomo para confecção de lâminas histológicas. As lâminas foram submetidas à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e fotografadas em aumento de 200x através do microscópio Olympus Bx41 (câmera SC30) do Setor de Anatomia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - IBB/UNESP.

Para as análises, foram utilizadas em torno de 200 fibras musculares selecionadas a partir de 4 - 6 campos aleatórios de cada lâmina de cada animal. Essa quantificação foi realizada através do *software* livre "*ImageJ*" (v.1.53) (SCHNEIDER *et al.*, 2012), em que foram analisados área, perímetro, diâmetros máximo e mínimo, angulação, circularidade e contagem de núcleos centrais.

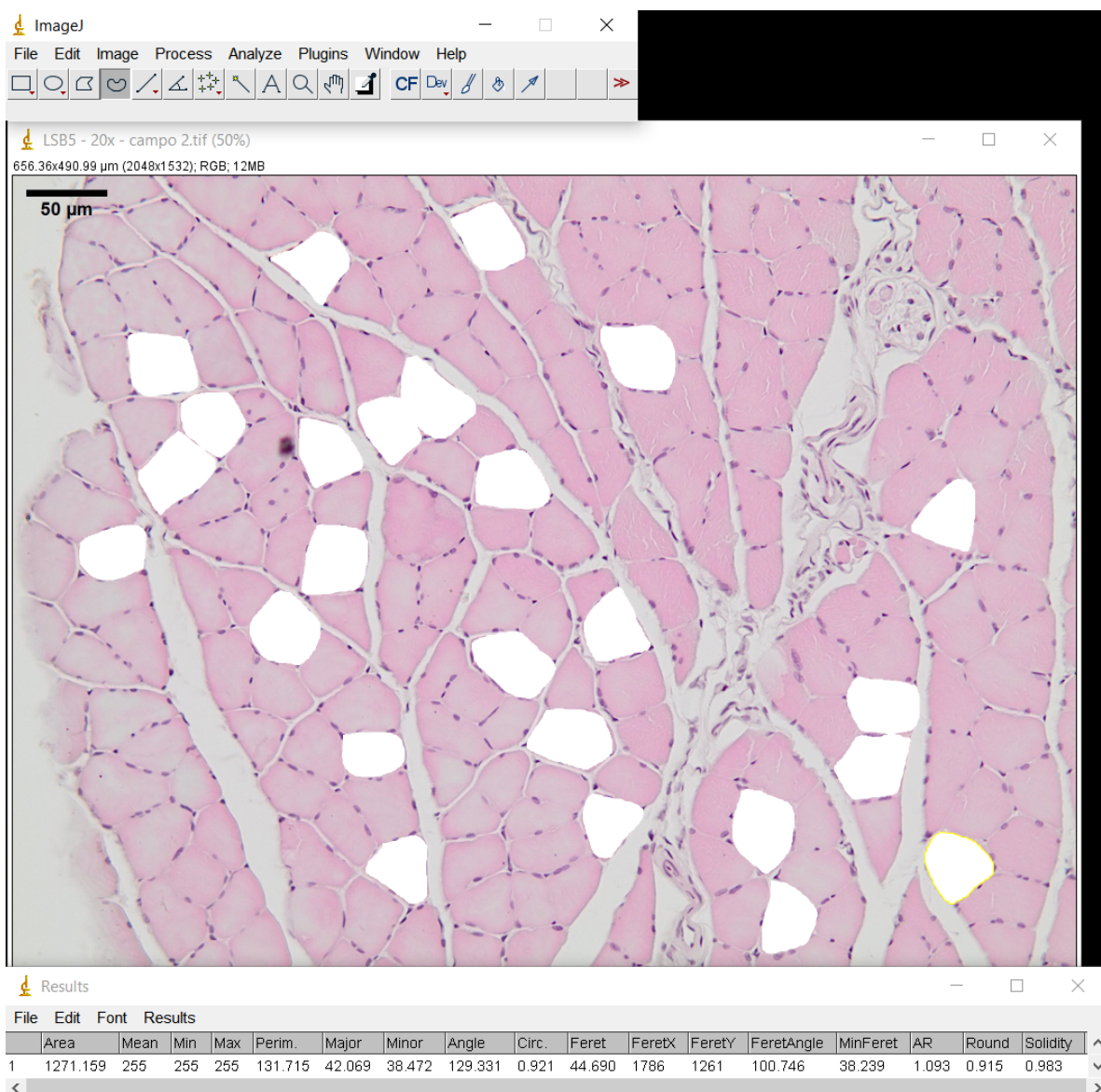


Figura 2: Screenshot da análise morfométrica das fibras musculares do músculo sóleo no software ImageJ.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo software Statistical Analysis System (SAS® v.9.3, Cary, North Carolina, USA). Para todos os dados foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, a partir dele, foram feitas as análises estatísticas adequadas. Os resultados, quando paramétricos, foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média; e quando não paramétricos em mediana, mínimo e máximo. O nível de significância considerado em todos os testes foi de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Período de 7 dias após a cirurgia

7 dias

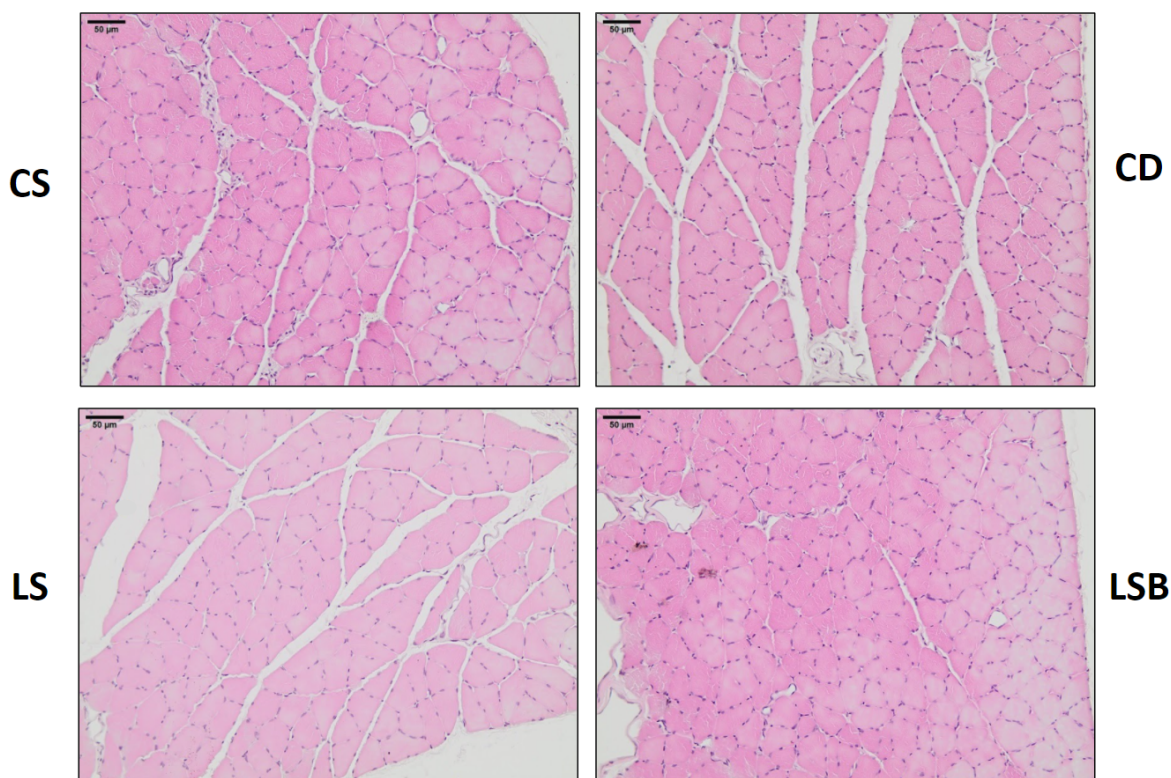


Figura 3: Fotomicrografias de secções transversais do músculo sóleo coradas em HE, do período de 7 dias após a cirurgia, sob microscopia de luz convencional. CS: Grupo Controle Sham; CD: Controle Desnervado; LS: Grupo Lesão + Sutura; LSB: Grupo Lesão + Sutura + Biopolímero.

De forma geral, aos 7 dias após lesão, não foi observada diferença morfológica entre os grupos experimentais, demonstrando fibras musculares em formato poligonal, com núcleos periféricos e pouca quantidade de matriz extracelular, ou seja, características próximas à normalidade. Em relação à morfometria não houve diferença estatística entre os grupos com relação à angulação (Fig. 3), circularidade da fibra muscular (Fig. 4), área (Fig. 5), diâmetro máximo (Fig. 6), perímetro (Fig. 7) e número de núcleos centrais (Fig. 8).

O único parâmetro que apresentou diferença significativa foi o diâmetro mínimo (Fig. 9). A análise estatística revelou que esses valores foram maiores no grupo Controle Sham (CS) quando comparados aos demais (CD, LS, LSB), que não apresentaram diferenças entre si.

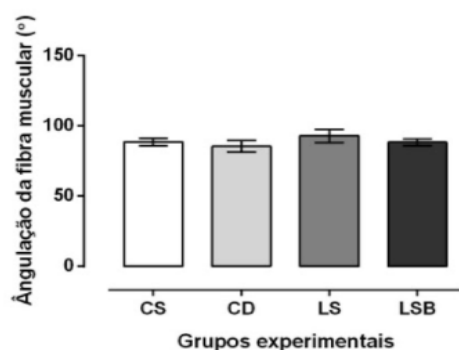


Figura 4: Gráfico da média e erro padrão da média da análise da angulação das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 7 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p>0,05$).

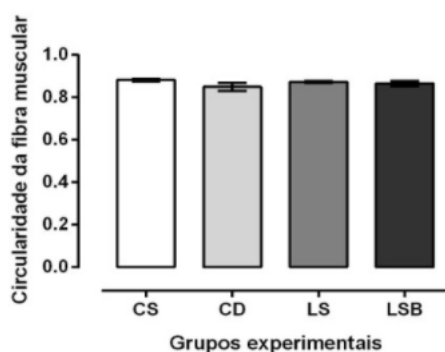


Figura 5: Gráfico da média e erro padrão da média da análise da circularidade das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 7 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p>0,05$).

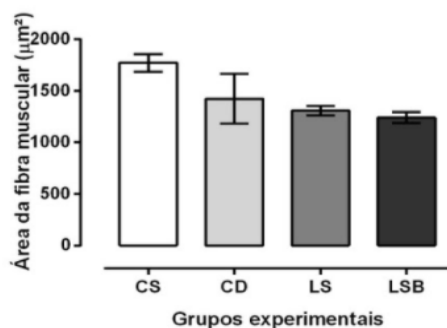


Figura 6: Gráfico da média e erro padrão da média da análise da área das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 7 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p<0,05$).

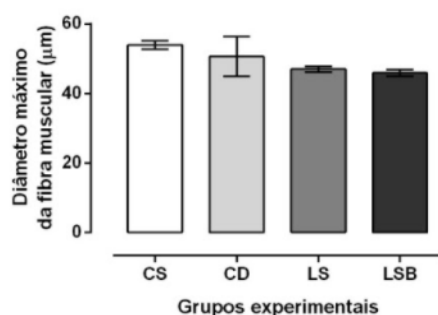


Figura 7: Gráfico da média e erro padrão da média da análise do diâmetro das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 7 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

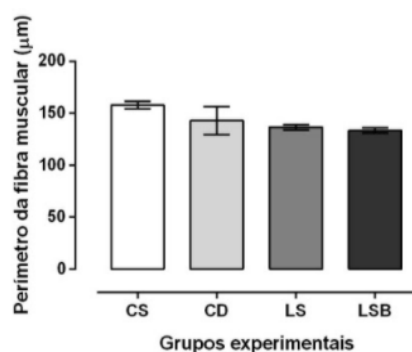


Figura 8: Gráfico da média e erro padrão da média da análise do perímetro das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 7 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

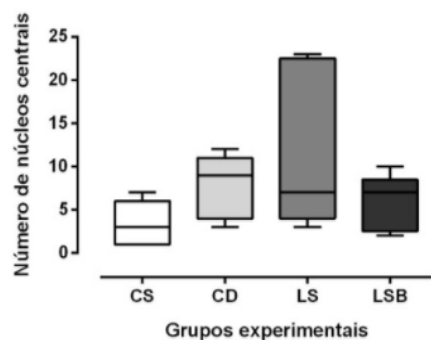


Figura 9: Gráfico da média e erro padrão da média da dos núcleos centrais das fibras musculares de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 7 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

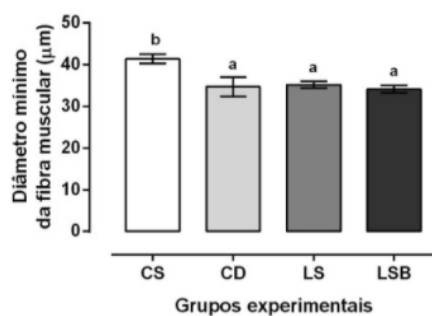


Figura 10: Gráfico da média e erro padrão da média da análise do diâmetro mínimo das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 7 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras diferentes indicam variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Período de 30 dias

30 dias

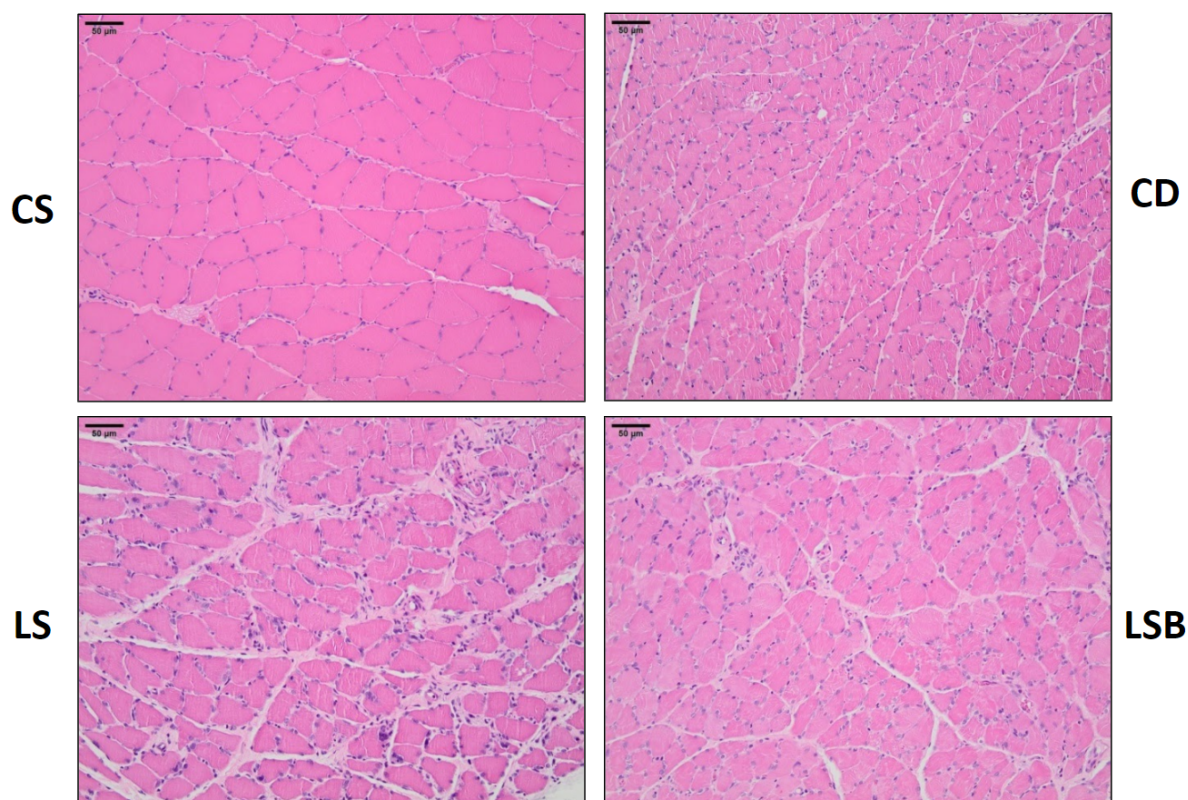


Figura 11: Fotomicrografias de seções transversais do músculo sóleo coradas em HE, do período de 30 dias após a cirurgia, sob microscopia de luz convencional. CS: Grupo Controle

Sham; CD: Controle Desnervado; LS: Grupo Lesão + Sutura; LSB: Grupo Lesão + Sutura + Biopolímero.

As mesmas características morfológicas encontradas aos 7 dias também foram observadas no grupo CS aos 30 dias após a lesão. Já o grupo CD apresentou aglomerados de pequenas fibras musculares, algumas delas com formato arredondado e outras com núcleo central, além de grande quantidade de matriz extracelular. Uma morfologia intermediária foi observada nos grupos LS e LSB, com algumas fibras em formato poligonal e outras arredondadas, alguns núcleos centrais e outros periféricos, e quantidade moderada de tecido conjuntivo. Frente à morfometria, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais em relação à angulação (Fig. 11) e a circularidade da fibra muscular (Fig. 12).

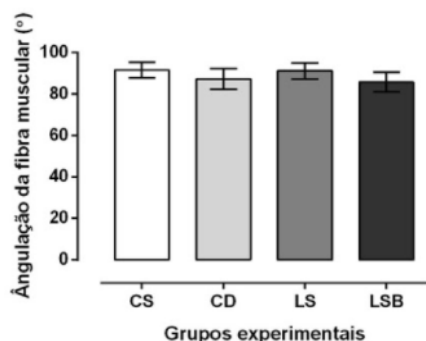


Figura 12: Gráfico da média e erro padrão da média da análise da angulação das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 30 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p > 0,05$).

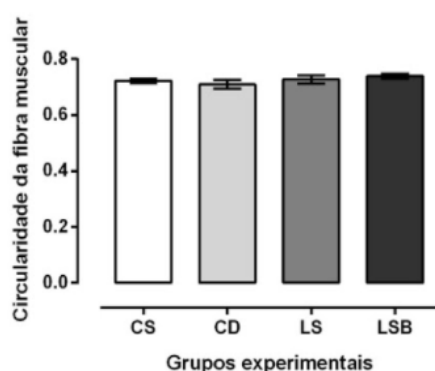


Figura 13: Gráfico da média e erro padrão da média da análise da circularidade das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 30 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p > 0,05$).

Já em relação à área (Fig. 13), diâmetro mínimo (Fig. 14) e diâmetro máximo (Fig. 15), a análise estatística mostrou que esses valores foram maiores no grupo Controle Sham (CS) quando comparados aos demais (CD, LS, LSB), que não apresentaram diferenças entre si.

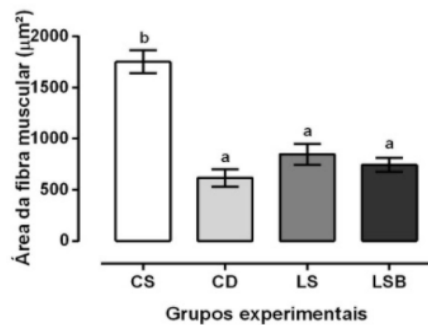


Figura 14: Gráfico da média e erro padrão da média da análise da área das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 30 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras diferentes indicam variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

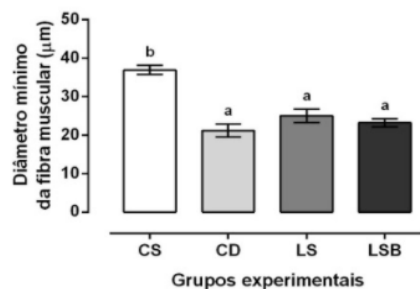


Figura 15: Gráfico da média e erro padrão da média da análise do diâmetro mínimo das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 30 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras diferentes indicam variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

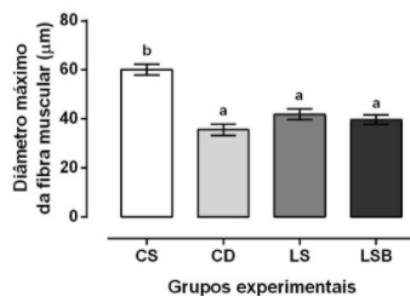


Figura 16: Gráfico da média e erro padrão da média da análise do diâmetro máximo das fibras musculares do músculo sóleo de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período

de 30 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras diferentes indicam variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A contagem de núcleos centrais (Fig. 16) revelou valores maiores no grupo CD quando comparado aos grupos CS e LSB ($p < 0,05$), e valores semelhantes ao grupo LS ($p > 0,05$). Já o grupo LSB apresentou resultado semelhante aos grupos CS e LS ($p > 0,05$), e diferente do grupo CD ($p < 0,05$).

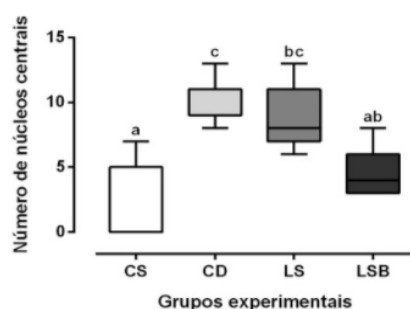


Figura 17: Gráfico da média e erro padrão da média da dos núcleos centrais das fibras musculares de todos os grupos experimentais (CS, CD, LS, LSB) do período de 30 dias. Técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

As LNPs são consideradas um problema de saúde relevante, cujos sinais e sintomas variam conforme a intensidade em que o nervo foi danificado. Mesmo com a vasta disponibilidade de informações relacionadas aos mecanismos patológicos das LNPs e sua recuperação, ainda é inexistente um tratamento que assegure uma recuperação morfofuncional completa em casos graves (PALISPIS E GUPTA, 2017). A maioria das opções de tratamento disponíveis para esse tipo de lesão depende de intervenções cirúrgicas, que por si só, se mostram insuficientes para restaurar a função motora, ou seja, a força e destreza muscular anterior à lesão (GRIFFIN *et al.*, 2013; SAKUMA *et al.*, 2016; PALISPIS E GUPTA, 2017).

Devido a isso, o modelo de LNP utilizado foi a transecção do nervo isquiático, simulando a neurotmesa de Seddon (1943) ou lesão de grau 5 de Sunderland (1951), seguida de reconstrução imediata do nervo isquiático via neurorrafia término-terminal associada ou não ao BHF. Este biopolímero, desenvolvido pelo Cevap da Unesp de Botucatu, São Paulo, Brasil, possui a singularidade de ser livre de sangue humano, sendo constituído apenas de derivados animais, o que o torna um produto distinto dos existentes e único no mundo, uma tecnologia brasileira comercialmente viável, e possuindo a vantagem

de não ser transmissor de doenças e a consequente redução de reações adversas (BUCHAIM *et al.*, 2019). Assim, este estudo buscou uma nova abordagem para a reparação das LNP em seu grau mais severo. No grupo CD, a remoção de um fragmento do nervo e o sepultamento dos cotos foram realizados a fim de evitar a regeneração espontânea (GAUDET *et al.*, 2011).

Os períodos experimentais de 7 e 30 dias após cirurgia, foram escolhidos visando uma observação da ação do BHF nas fases iniciais de degeneração e regeneração (ZIGMOND e ECHEVARRIA, 2019).

De acordo com Langer *et al.* (2018), o dano causado por desnervação se dá por atrofia das fibras musculares, não por perda das mesmas e, segundo Menorca *et al.* (2013), as fibras sofrem atrofia depois de, no mínimo, três semanas após sofrer desnervação, devido aos depósitos de colágeno que se formam no endomísio e no perimísio.

Com isso, temos que o período de 7 dias foi insuficiente para que ocorresse atrofia muscular, sendo um fator que pode explicar as características dentro da normalidade observadas nas fibras musculares esqueléticas de todos os grupos do período de 7 dias.

O grupo CS do período de 30 dias apresentou características morfológicas semelhantes ao grupo CS de 7 dias, próximas à normalidade, o que pode se dar ao fato dos animais desses grupos terem sofrido apenas debridaç o do nervo isquiático, ou seja, uma lesão menos severa comparada à neurotmese, segundo a classificação de Seddon (1943).

Aos 30 dias após lesão, a análise do músculo sóleo demonstrou similaridade entre os grupos lesionados (CD, LS e LSB) frente à maioria dos parâmetros analisados. Já o grupo LSB, em que foi utilizado o BHF em conjunto com a sutura, os valores referentes à quantidade de núcleo centrais foram mais baixos, estatisticamente semelhantes aos valores de CS.

Folker e Baylies (2013), observaram grandes quantidades de fibras musculares com núcleos centrais em pacientes acometidos por uma grande variedade de doenças musculares e descreveram que trata-se de um sinal de reparo contínuo.

A presença destes núcleos centrais está frequentemente associada com o processo de regeneração muscular (MURGATROYD & CHALMERS, 1980; ROMAN & GOMES, 2018).

Após LNP, ocorre a ativação, proliferação, fusão e internalização de células satélites, precursoras miogênicas presentes sob a lâmina basal das fibras

musculares (CARRARO *et al.*, 2015). Essa reorganização dos mionúcleos é um marcador de desordem muscular e atrofia, e sua presença foi observada em fibras musculares severamente atroficas até 7 meses após desnervação em roedores (CARRARO *et al.*, 2015).

Considerando que os valores do número de núcleos centrais do grupo LSB se aproximaram dos valores do grupo CS podemos sugerir que a regeneração está em curso, com menor grau de fibrose (MULLER *et al.*, 2007; TUFFAHA *et al.*, 2016) e atrofia muscular (MOIMAS *et al.*, 2013; CARRARO *et al.*, 2015).

Já no grupo CD, foram observadas maiores quantidades de núcleos centrais, semelhantes ao grupo LS. Isso é um indicativo de que o grupo LS apresentou regeneração mais tardia quando comparado ao LSB, ou seja, ao uso do biopolímero.

As suturas, como a realizada no grupo LS, geralmente são os métodos que apresentam os melhores resultados, porém também são bastante invasivos devido ao manuseio excessivo dos cotos nervosos e a possibilidade de um processo inflamatório acentuado (NARAKAS, 1988; HUSSAIN *et al.*, 2020), o que pode retardar a regeneração.

Vários estudos têm demonstrado bons resultados após o uso de selante de fibrina, como em escaras (GATTI *et al.*, 2011), no reparo de defeitos ósseos (MACHADO *et al.*, 2015), na regeneração de nervos periféricos com foco na morfologia nervosa e avaliação do potencial de ação motora (MARTINS *et al.*, 2005; FÉLIX *et al.*, 2013; BUCHAIM *et al.*, 2015) e em células-tronco mesenquimais associadas ao selante na tubulização do nervo isquiático (CARTAROZZI *et al.*, 2015).

Os resultados positivos obtidos são compatíveis com resultados obtidos por outros autores que utilizaram o BHF para tratar LNPs em conjunto com outras técnicas (BUCHAIM *et al.*, 2015; BISCOLA *et al.*, 2016), e semelhantes aos encontrados no tratamento com selantes disponíveis comercialmente (JUAN *et al.*, 1995).

Neste trabalho foi feita a opção de utilização de um modelo experimental de LNP por neurotmesa (transecção completa) do nervo isquiático, levando-se em conta que neste tipo de lesão, não há regeneração espontânea sem intervenção cirúrgica (GRINSELL E KEATING, 2014), e com vistas a permitir a investigação de novos métodos cirúrgicos e avaliar a efetividade de medicamentos e/ou tratamentos coadjuvantes.

A fim de obter uma melhoria na recuperação morfológica e funcional após LNP, há uma busca por novos métodos cirúrgicos que auxiliem o processo de

regeneração do nervo periférico. Visando proporcionar suporte estrutural para a reconstrução nervosa por neurorrafia, foi utilizado neste estudo um único ponto de sutura com a adição do selante de fibrina (CEVAP) como terapia coadjuvante. Esse selante possui uma singularidade, que está associada à redução de reações adversas por ser livre de sangue humano, além de ser mais fácil de manusear durante a cirurgia e possuir fórmula customizável. (THOMAZINI-SANTOS *et al.*, 2001; BISCOLA *et al.*, 2016; BISCOLA, *et al.*, 2017).

CONCLUSÃO

Os resultados aqui encontrados são parte de um projeto de Mestrado onde outros parâmetros foram analisados, mas sugerem aproximação do grupo LSB ao CS. Assim, o efeito coadjuvante do selante de fibrina mostrou-se promissor, mas mais estudos são necessários até que se possa indicar a redução do número de suturas ou mesmo sua total substituição para o tratamento da reconstrução nervosa periférica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZIL, A. P.; WERNIG, A. Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation. **Journal of Neurocytology**, v. 18, n. 6, p. 833-45, 1989.

ASPLUND, M., *et al.* Functional Recovery after peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. **Neuroepidemiology**, v. 32, n. 3, p.217-228, 2009.

ATTAR, B. M. *et al.* Effectiveness of fibrin adhesive in facial nerve anastomosis in dogs compared with standard microsuturing technique. **Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 70, p.10, (2012)

BARBIZAN, R. *et al.* Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63260, 2013.

BARBOSA R. I. *et al.*, Comparative effects of wavelengths of low-power laser in regeneration of sciatic nerve in rats following crushing lesion. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 3, p.410-430, 2010.

BISCOLA, N.P. *et al.* Long-Standing Motor and Sensory Recovery following Acute Fibrin Sealant Based Neonatal Sciatic Nerve Repair. **Neural plasticity** v. 2016, 2016

BISCOLA, N. P. *et al.* Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, 2017.

BOGDANIS, G. C. Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue. **Frontiers in Physiology**, 2012.

BORISOV, A. B.; CARLSON, B. M. Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. **The Anatomical Record**, v. 258, n. 3, p. 305-18, 2000.

BUCHAIM, R. L. *et al.* Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. **Injury**, v. 46, n. 4, p. 655-660, 2015.

CARTAROZZI, L. P. *et al.* Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. **Brain research bulletin**, v. 112, p. 14-24, 2015.

CHARGÉ, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 209-38, 2004.

FELIX, S. P. *et al.* Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. **Microsurgery**, v. 33, n. 6, p. 468-77, Sep 2013.

FOLKER, E. S.; BAYLIES, M. K., Nuclear positioning in muscle development and disease. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 363, 2013.

GASPAROTTO, V. P. *et al.* A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. **Stem cell research & therapy**, v. 5, n. 3, p. 78, 2014.

GATTI, M. *et al.* Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 2, p. 226- 229, 2011.

GORDON, T. Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation. **International journal of molecular sciences** v. 21, p. 22, 2020.

GRIFFIN, J. W. *et al.* Peripheral nerve repair and reconstruction. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 95, n. 23, p. 2144-2151, 2013.

GRINSELL, D.; KEATING, C. P. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 698256, 2014.

GUTMANN, E.; ZELENKA, J. Morphological changes in the denervated muscle. In: (Ed.). **The denervated muscle: Springer**, 1962. p.57-102.

HUSSAIN, G. *et al.* Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. **International journal of biological sciences**, v. 16 p.116-134, 2020.

JANSSEN, I. *et al.* Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. **Journal of applied physiology** v. 89, p. 81, 1985.

JUAN, F. C. *et al.* Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom: preliminary results. **São Paulo Medical Journal** v. 113 p. 5, 1995.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 10^a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

LANGER, H. T., *et al.* Muscle Atrophy Due to Nerve Damage is Accompanied by Elevated Myofibrillar Protein Synthesis Rate. **Frontiers in Physiology**, 2018.

LIN, T. *et al.* Hydrogel derived from porcine decellularized nerve tissue as a promising biomaterial for repairing peripheral nerve defects. **Acta biomaterialia**. 2018.

MACHADO, E. G. *et al.* A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. **Acta histochemica**, v. 117, n. 3, p. 288-296, 2015.

MARTINS, R. S. *et al.* Electrophysiologic assessment of regeneration in rat sciatic nerve repair using suture, fibrin glue or a combination of both techniques. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, n. 3A, p. 601-4, 2005.

MENORCA, R. *et al.* Peripheral Nerve Trauma: Mechanisms of Injury and Recovery. **Hand clinics** v. 29 p. 3, 2013.

MOIMAS, S. *et al.* Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. **Gene therapy**, v. 20, n. 10, p. 1014, 2013.

MULLER, F. L. *et al.* Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. **American journal of physiology-Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 3, p. R1159-R1168, 2007.

MURGATROYD, L. B.; CHALMERS, D. T., A histological and histochemical study of normal and diseased skeletal muscle in marmosets *Callithrix jacchus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 90, n. 3, p. 373-378, 1980.

MURPHY, A. C. *et al.* Structure, function, and control of the human musculoskeletal network. **PLoS biology**, v. 16, 2018.30

NARAKAS, A. The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. **The Orthopedic Clinics of North America**, v. 19, n.1, p.187-199, 1988.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE. Peripheral Neuropathy Fact Sheet. **Office of Communications and Public Liaison National Institute of Neurological Disorders and Stroke**, Bethesda. Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Peripheral-Neuropathy-Fact-Sheet>. Acesso em 01 jul. 2021.

NEUMANN, D. **Kinesiology of The Musculoskeletal System: Foundations for Rehabilitation**. 2ª Edição, St. Louis: Mosby Elsevier, 2009, p. 171.

NGUYEN, Q. T.; SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 9, p. 861-7, 2002.

OMAR, A. *et al.* Physiology, Neuromuscular Junction, **StatPearls Publishing**, 2021.

PALISPIS W. A., GUPTA R. Surgical repair in humans after traumatic nerve injury provides limited functional neural regeneration in adults. **Experimental Neurology**. 2017.

PRATT, S. J. P. *et al.* Recovery of altered neuromuscular junction in *mdx* mice after injury. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 153-164, 2015

RICH, M. M.; LICHTMAN, J. W. In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. **Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 1781-805, 1989.

ROMAN, W.; GOMES, E. R., Nuclear positioning in skeletal muscle. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 82, p. 51–56, 2018.

SAKUMA, M. *et al.* Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. **European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 3, p. 451-462, 2016.

SCHMALBRUCH, H.; LEWIS, D. M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 4, p. 617-26, 2000.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671, 2012. ISSN 1548-7105.

SEDDON, H. J. THREE TYPES OF NERVE INJURY. **Brain**, v. 66 p. 237–288, 1943

STAFFORD, M.; PENG, P; HILL, D. Sciatica: a review of history, epidemiology, pathogenesis, and the role of epidural steroid injection in management. **British Journal of Anaesthesia**, v. 99, p. 461-73, 2007

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain**, v. 74, n. 4, p. 491-516, 1951.

TUFFAHA, S. H. *et al.* Growth hormone therapy accelerates axonal regeneration, promotes motor reinnervation, and reduces muscle atrophy following peripheral nerve injury. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 137, n. 6, p. 1771-1780, 2016.

ZIGMOND, R. E.; ECHEVARRIA, F. D. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. **Progress in neurobiology**, 2019.