



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Ana Paula Silveira Leite

**Avaliação da associação do selante
heterólogo de fibrina à tubulização na
reconstrução nervosa após lesão nervosa
periférica: com foco nas junções
neuromusculares e proteínas associadas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Selma Maria Michelin Matheus
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Cintia Yuri Matsumura

Botucatu (2021)

Ana Paula Silveira Leite

Avaliação da associação do selante heterólogo
de fibrina à tubulização na reconstrução nervosa
após lesão nervosa periférica: com foco nas
junções neuromusculares e proteínas
associadas

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, como
requisito para obtenção do título de
Doutora em Cirurgia e Medicina
Translacional.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Selma Maria Michelin Matheus
Coorientador(a): Prof(a).Dr(a). Cintia Yuri Matsumura

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Leite, Ana Paula Silveira.

Avaliação da associação do selante heterólogo de fibrina à tubulização na reconstrução nervosa após lesão nervosa periférica : com foco nas junções neuromusculares e proteínas associadas / Ana Paula Silveira Leite. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Selma Maria Michelin Matheus

Coorientador: Cintia Yuri Inamura

Capes: 20600003

1. Fibrina. 2. Junção neuromuscular. 3. Biopolímeros.
4. Proteínas.

Palavras-chave: Biopolímero de fibrina; Junção neuromuscular; Lesão nervosa periférica.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Carlos e Rose, e a minha irmã
Juliana, sem o apoio e o amor de vocês eu não seria capaz de concluir
mais essa etapa, muito obrigada.

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me guiar nesta jornada.

Aos meus pais, Carlos e Rose, pelo apoio e amor incondicional.

À minha irmã, Juliana, minha ouvinte fiel e melhor amiga, obrigada por sempre ser tão presente em minha vida.

Aos meus avós, João e Antonia, Edison e Judite por serem meu porto seguro de carinho e cuidado.

A minha família Cafofo, pelo apoio e companheirismo diário.

A minha orientadora, Professora Dr^a Selma M. M. Matheus, por toda a experiência e conhecimento compartilhado, e principalmente por todo carinho que sempre teve comigo, muito obrigada.

A minha coorientadora professora Dra Cintia Yuri Matsumura, pelo auxílio com as análises de Western Blot deste estudo e pela extrema atenção de sempre, obrigada.

Ao CEVAP (UNESP/Botucatu) por gentilmente ceder o biopolímero de fibrina para a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Cirurgia e Medicina Translacional, ao Instituto de Biociências, da UNESP de Botucatu e a UNIPEX, Unidade de pesquisa experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), pela estrutura e apoio para a realização deste trabalho, e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos e também pela concessão de bolsa PDSE para doutorado sanduíche.

Ao professor Tom Gillingwater, que me recebeu prontamente em seu laboratório e em seu grupo de pesquisa.

Á todos os professores e funcionários do departamento de Anatomia pelo auxílio e companheirismo de sempre.

Agradeço também aos funcionários da Unipex, cujo conhecimento e auxílio foram indispensáveis para realização deste

estudo, principalmente ao Bardella, Robson, Sílvia e Diego por todo o cuidado com os animais utilizados neste estudo. E ao Leandro pelo auxílio com as amostras, muito obrigada!

Em especial agradeço ao Zé, meu fiel companheiro de todas as cirurgias e também dos pós-operatórios. Zé, sem a sua ajuda eu não conseguiria concluir este estudo.

A Shelly, do Centro de Microscopia Eletrônica, por todo auxílio com as imagens utilizando microscopia confocal e pela amizade e parceria de sempre, obrigada!

Aos amigos do laboratório de Anatomia e da Universidade de Edimburgo, pela amizade, apoio e companheirismo diários.

Em especial ao Felipe, meu companheiro de laboratório, obrigada por todas as longas conversas sobre artigos, resultados e sobre a vida, vou sentir muito a sua falta no meu dia a dia.

A Carina, Talita e Marília, por me ensinarem tanto e serem amigas que vou levar para a vida.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa pela disposição e colaborações fundamentais para este trabalho.

Aos animais desse experimento pelas vidas doadas, as quais espero ter feito valia no desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada!

Epígrafe

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

(Marie Curie)

RESUMO

As lesões nervosas periféricas podem causar interrupção do impulso nervoso, e mesmo após intervenção cirúrgica é comum que a recuperação funcional não seja completa, nesse sentido é importante investigar a resposta das junções neuromusculares (JNMs), responsáveis pela interação entre o axônio motor e sua musculatura alvo. Na busca por novas terapias que potencializem a regeneração, se destacam os tubos ou conduítes, que podem ser de variados materiais e fornecem um conduto para o crescimento axonal. Combinado a esses tubos o uso de adjuvantes pode ser acrescido, dentre eles destaca-se o biopolímero de fibrina (FB) com possível fator protetor e trófico no ambiente da lesão. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a regeneração das Junções Neuromusculares (JNMs) e proteínas associadas, após lesão nervosa periférica, seguida de técnica de tubulização e uso do FB. Foram utilizados 52 ratos *Wistar* machos adultos, distribuídos em 4 grupos experimentais: Controle Sham (S), Controle Desnervado (D); Tubulização (PCL) e Tubulização + Biopolímero de Fibrina (FB). No grupo S, foi realizada apenas incisão, localização e debridaç o do nervo isquiático. Nos Grupos D, PCL e FB foram realizados modelos de lesão completa, com gap de 8 mm nos grupos PCL e FB. Após neurotmesa no grupo D, os cotos foram invertidos e fixados a tela subcutânea. Nos grupos PCL e FB, após a lesão, os cotos nervosos foram inseridos e fixados na prótese tubular de policaprolactona (PCL) de 12mm com fio de sutura 10-0. No grupo FB foi adicionado após a fixa o dos cotos ao tubo 500 l do FB. Antes da realiza o dos procedimentos cirúrgicos, e quinzenalmente, foram realizadas análises no Catwalk em todos os animais. Noventa dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram pesados, os músculos sóleos e nervos isquiáticos direitos foram coletados, fixados e submetidos as seguintes análises: morfológica e morfométrica dos receptores de acetilcolina (AChRs) através de microscopia confocal de varredura a laser; Análise morfológica e morfométrica do nervo isquiático; Quantifica o proteica de células de Schwann, agrina, LRP4, MuSK, rapsina, MMP3, MyoD, Miogenina, MURF1 e Atrogina-1 e dos AChRs: alfa, gama e  psilon. A análise morfológica e morfométrica do nervo isquiático compactua com a reconexão dos cotos nervosos observada nos grupos PCL e FB, onde para a maioria dos parâmetros houve equivalência dos valores entre os grupos, exceto pela área dos axônios do grupo PCL, os quais foram menores que os do grupo S. Na fun o motora, não houve altera o entre os grupos no que se refere ao  ndice funcional do fibular, ainda que em outros parâmetros como área da pegada e contato máximo com a plataforma, os grupos experimentais não apresentaram valores similares aos valores do grupo S. Na análise dos AChRs, a morfologia, os valores do  ndice de compacta o, da área dos AChRs e da placa motora do grupo FB foram os únicos similares ao grupo S. Pode-se concluir considerando os resultados obtidos que o uso do FB associado a tubuliza o promoveu uma estabiliza o dos AChRs, potencializando a regenera o neuromuscular.

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries may cause interruption of the nerve impulse, and even after surgical intervention it is common that functional recovery is not complete. In this sense it is important to investigate the response of neuromuscular junctions (NMJs), responsible for the interaction between the motor axon and its target muscle. In the search for new therapies that enhance regeneration, tubes or conduits, which can be made of various materials and provide a conduit for axonal growth, stand out. In combination with these tubes, the use of adjuvants may be added; among them, fibrin biopolymer (FB) stands out as a possible protective and trophic factor in the injury environment. Thus, the objective of this work was to evaluate the regeneration of Neuromuscular Junctions (NMJs) and associated proteins, after peripheral nerve injury, followed by tubulization technique and use of FB. We used 52 adults male Wistar rats, distributed in 4 experimental groups: Sham Control (S), Denervated Control (D); Tubulization (PCL) and Tubulization + Fibrin Biopolymer (FB). In Group S, only incision, localization and debridement of the ischiatic nerve was performed. In Groups D, PCL and FB, complete injury models were performed, with an 8 mm gap in the PCL and FB groups. After neurotmesis in Group D, the stumps were inverted and fixed to subcutaneous mesh. In the PCL and FB groups, after injury, the nerve stumps were inserted and fixed to the 12-mm polycaprolactone (PCL) tubular prosthesis with 10-0 suture points. In the FB group, 500µl of FB was added after fixing the stumps to the tube. Before the surgical procedures were performed, and every fifteen days, Catwalk analyses were performed on all animals. Ninety days after the surgical procedure, the animals were weighed, the soleus muscles and right ischiatic nerves were collected, fixed and subjected to the following analyses: morphological and morphometric analysis of acetylcholine receptors (AChRs) by laser scanning confocal microscopy; morphological and morphometric analysis of the ischiatic nerve; protein quantification of alpha, gamma and epsilon AChRs, Schwann cells, agrin, LRP4, MuSK, rapsin, MMP3, MyoD, Myogenin, MURF1 and Atrogin-1. The morphological and morphometric analysis of the ischiatic nerve agrees with the reconnection of the nerve stumps observed in the PCL and FB groups, where for most parameters there was equivalence of values among the groups, except for the area of the axons of the PCL group, which were smaller than those of the S group. There was no alteration in motor function (fibular functional index) among the groups, although in other parameters such as the print area and max contact area, the experimental groups did not reach the values of group S. In the analysis of the AChRs, the morphology, the values of the compactness index, the area of the AChRs and the endplate of the FB group were similar to the S group, different from the other groups. In addition, the FB showed higher values of S100 protein, and epsilon subunit, when compared to group S and all other groups respectively. It can be concluded considering the results obtained that the use of FB associated with tubulization promoted a stabilization of the AChRs, potentiating neuromuscular regeneration.

Sumário

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	15
1.0 Introdução	17
1.1 Lesão nervosa periférica	17
1.2 Junção Neuromuscular (JNMs)	20
1.3 Proteínas Envolvidas na Estabilização e Manutenção das JNMS.....	26
1.3.1 Agrina	26
1.3.2 LRP4	26
1.3.3 MuSK.....	27
1.3.4 Dok7	28
1.3.5 Rapsina	28
1.4 JNMs e as lesões nervosas periféricas	29
1.5 Justificativa.....	30
1.6 Objetivos	31
1.6.1 Objetivos Específicos	31
2.0 Materiais e Métodos	31
2.1 Preparação das próteses para tubulização	31
2.2 Procedimento cirúrgico.....	32
2.3 Avaliação da marcha através do aparelho “Catwalk”	35
2.4 Microscopia Confocal para AChRs.....	37
2.5 Análise dos AChRs utilizando o plugin “NMJ- morph”	38
2.6 Análise morfológica e morfométrica do nervo isquiático	42
2.7 Análise da Expressão proteica por Western Blotting.....	43
2.8 Análise Estatística	44
Referências	45
Capítulo 1 - Acetylcholine Receptors of the Neuromuscular Junctions present normal distribution after peripheral nerve injury and repair trough nerve guidance associated with fibrin Biopolymer.....	54
Anexos - Certificado CEUA	87

Lista de Abreviaturas

ACh- Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AChR – Receptores de acetilcolina

BF- Biopolímero de Fibrina

Ca²⁺ - Cálcio

CEVAP- Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

D- Grupo Desnervado

Dok-7 – Proteína citoplasmática derivada da quinase 7

EPL- *Print length* lado lesionado

ETS- *Toe spread* lado lesionado

EUA- Estados Unidos da América

FMB- Faculdade de Medicina de Botucatu

g- Gramas

GAPDH- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDNF- Fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glia

IFF- Índice Funcional do Fibular

JNM- Junção Neuromuscular

Kg- Quilogramas

Lrp4 - Receptor lipoprotéico relacionado a proteína 4

mg- Miligramas

μL- Microlitros

μm- Micrômetros

MMP3- Metaloproteinase 3 da matriz

MRF4- *Muscle regulatory factor 4*

MuSK- Receptor tirosina quinase músculo-específico

MyF5- *Myogenic factor 5*

MyoD- *Myoblast determination protein 1*

NGF- Fator de crescimento neural

NPL- *Print length* lado normal

NTS- *Toe spread* lado normal

PBS- Tampão fosfato-salino

PCL- Policaprolactona/ grupo tubulização a base de policaprolactona

PLA- Políácido láctico

RIPA- *Radioimmunoprecipitation assay buffer*

S- Grupo Sham

SNARE- *Soluble N-ethylmale-imide-sensitive factor-attachment protein receptors*

UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas

1 Introdução

1.1 Lesão Nervosa Periférica

As lesões nervosas periféricas causam grandes alterações no estilo de vida dos pacientes acometidos, principalmente em decorrência do permanente déficit motor[1]. Dentre as etiologias mais comuns para este tipo de lesão estão: ferimentos a bala e acidentes automobilísticos[2]. De todos os pacientes admitidos nos hospitais em decorrência de um trauma, cerca de 2,8-5% apresentam lesões nervosas periféricas[3] e mais de 100 mil pacientes precisam de intervenção cirúrgica para reparação nervosa [4]. Este tipo de injúria nervosa também pode ser decorrente de procedimentos cirúrgicos, sendo os de cabeça e pescoço os mais comuns, com índice em torno de 16 a 17%.[5] Além disso, durante intervenções cirúrgicas com a realização de bloqueio nervoso periférico para anestesia, podem ocorrer lesões, na taxa de 3,5 a 5 pacientes a cada 10 mil procedimentos[5]. Independentemente da habilidade dos cirurgiões, este tipo de injúria pode ser decorrente da presença de variações anatômicas, que são extremamente comuns [7]. As classificações mais utilizadas até hoje para a definição dos tipos de lesões nervosas periféricas, foram as estabelecidas por Seddon e Sunderland [8]·[9].

Na classificação de Seddon as lesões são divididas em 3 tipos: a neuropraxia, que seria a forma mais leve, com perda da bainha de mielina, mas não do tecido nervoso, causando de forma temporária dano na transmissão do impulso nervoso; a axonotmese, que seria a forma intermediária, onde há dano no tecido nervoso, porém com parcial preservação da estrutura dos envoltórios conectivos (epineuro, perineuro e endoneuro) que protegem o nervo. A forma mais severa nesta classificação é a neurotmese, onde o dano é generalizado, atingindo a bainha de mielina, os envoltórios conectivos e os axônios. Neste caso a intervenção cirúrgica é necessária para que haja alguma regeneração e recuperação motora após lesão[8]

Na classificação descrita por Sunderland, são descritos 5 estágios possíveis de lesão, o primeiro corresponde a neuropraxia descrita por Seddon, já o 2º, 3º e 4º níveis podem ser comparados a axonotmese descrita anteriormente, porém aqui o estágio mais leve é onde há lesão a nível de bainha de mielina e axônios, no 3º nível

a lesão atinge além da bainha e dos axônios o endoneuro e no 4º a lesão é a nível de perineuro; o 5º e mais grave estágio é o equivalente a neurotmesa [9].

Conforme o nível de lesão e o dano gerado, é bem conhecida a capacidade que o sistema nervoso periférico possui de conduzir um processo intrínseco de regeneração, a chamada Degeneração Walleriana, a qual se inicia pela ativação das células nervosas lesionadas que criam um ambiente permissivo no coto distal para a chegada de inúmeras células, como as células de Schwann, os fibroblastos, as células do sistema imune e células endoteliais[10]. Todo o microambiente envolvido nos processos de degeneração e regeneração pós-lesão é extremamente importante. As células de Schwann e os macrófagos residentes favorecem a regeneração dos axônios, pela liberação de neurotrofinas e fagocitose dos restos celulares que, ao contrário, liberam inibidores do crescimento nervoso[11][12]. Porém, uma resposta inflamatória prolongada pode ser prejudicial durante o processo de regeneração estando, por vezes, associada a sintomas negativos pós lesão, como os quadros de dor neuropáticas [13]. As células de Schwann, células da glia do sistema nervoso periférico, são importantes nesse processo pois, além de apoiar e nutrir os neurônios, tem capacidade de proliferação, migração e regeneração, fornecendo suporte trófico e conduzindo o processo de regeneração do coto proximal para o distal, direcionadas pelas bandas de Büngner, estruturas tubulares que guiam os axônios no caminho de volta a seus órgãos alvo[14][15][16]. Nesse crescimento, os axônios em regeneração precisam atravessar uma ponte formada principalmente por componentes da matriz extracelular, além de macrófagos, células endoteliais e as próprias células de Schwann, estabelecida entre os cotos nervosos, ajudando no direcionamento da reinervação [17][18].

Mesmo após as intervenções cirúrgicas os resultados permanecem imprevisíveis[19] e com déficits permanentes na função motora, podendo inclusive ocorrer quadros de paralisia, fraqueza e até mesmo dor crônica[20]. É amplamente relatado na literatura casos clínicos em que pacientes acometidos por lesões nervosas periféricas são afetados por dores crônicas na região atingida, essas dores podem se tornar o principal problema de saúde destes indivíduos, já que os

tratamentos disponíveis são ainda escassos [21].

O padrão ouro para o reparo das lesões nervosas periféricas é a neurorrafia término terminal, na qual os cotos são reconectados utilizando pontos de sutura [22]. Quando a lesão resulta em um gap maior entre os cotos, não é possível realizar a reconexão dos mesmos via neurorrafia sem que ocorra tensão no local do reparo, e então nesses casos os enxertos são os mais indicados [23]. O auto enxerto é a técnica mais utilizada, porém dados na literatura mostram uma taxa de 50% de chance de recuperação motora e desvantagens como: necessidade de duas cirurgias, dor, formação de neuroma e dificuldade de obter um enxerto de tamanho correto. A precisão na realização do enxerto é necessária para evitar a ocorrência de mismatch, ou seja, o crescimento inadequado dos axônios fora de seu tubo endoneural [24]. Visando a melhoria nos reparos cirúrgicos inúmeras alternativas surgiram para a correção de lesões maiores, dentre estas os conduítes artificiais e biológicos[25].

Os conduítes ou tubos formam uma ponte entre os cotos, provendo um ambiente que permite o crescimento axonal[26]. Existem 5 tipos principais de design de conduítes: oco/não poroso, poroso, com estriações, multicanais e os com filtros[23]. As matrizes utilizadas para a construção de conduítes são variadas, os materiais biológicos mais utilizados são o colágeno, a fibronectina e a laminina[27], porém, sua estrutura não é tão fácil de ser reproduzida comparada a dos materiais sintéticos. Nesse sentido, se destacam os polímeros: poliácido láctico (PLA) e a policaprolactona (PCL), com propriedades bem definidas e de simples reprodução[28].

As propriedades ideais, portanto, para a criação de um conduíte adequado são: características estruturais que permitam alinhamento dos axônios regenerados, propriedades mecânicas para fornecer suporte estrutural, permeabilidade para fornecer suporte trófico, além de flexibilidade e biodegradabilidade que facilitam o procedimento cirúrgico[29].

Em estudo de revisão, Bellaire et al, 2021 [25] através do acompanhamento de procedimentos realizados em 2006 em inúmeras clínicas nos estados americanos da Califórnia e Flórida, mostraram que, a técnica de reconexão via sutura (neurorrafia) ainda era utilizada em 90% dos procedimentos cirúrgicos, e não havia

nenhum registro do uso de conduítes para o reparo nervoso. Já em 2011 esses índices se alteraram para 70,2% de neurorrafias e mais de 400 procedimentos envolvendo o uso de conduítes, o que constituiu 13,4% do total.

Além dos conduítes, outras técnicas que buscam mimetizar os múltiplos aspectos do microambiente de regeneração vêm sendo testadas. [30]. Dentre as terapias testadas estão as com células tronco[31] e as com fatores de crescimento nervoso, como o fator de crescimento neural (NGF)[32] e o fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glia (GDNF)[33]. As colas de fibrina também têm sido amplamente utilizadas no reparo das lesões nervosas periféricas, seja substituindo ou complementando a técnica de neurorrafia, mas também como possível fator trófico e de proteção no ambiente da lesão[34]. Estas colas são materiais biológicos compostos basicamente por fibrinogênio e trombina. Na presença de cálcio e do fator de coagulação VIII, a trombina cliva o fibrinogênio em monômeros de fibrina, formando um coágulo estável, com boa capacidade hemostática e adesiva[35].

O biopolímero de fibrina desenvolvido por pesquisadores brasileiros do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), tem como diferencial sua composição livre de sangue humano. Este selante é composto por 3 frações: na primeira está a giroxina, proteína trombina-like advinda do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*; na segunda fração se encontra o crioprecipitado de plasma fresco congelado advindo do sangue de búfalos *Bubalus bubalis*, contendo fibrinogênio, os fatores de coagulação VIII e XIII e fibronectina. A terceira fração contém o diluente, cloreto de cálcio, molécula necessária para que ocorra a quebra do fibrinogênio em monômeros de fibrina[36]. Este biopolímero apresentou resultados positivos no tratamento das lesões nervosas periféricas, no que se refere ao crescimento axonal e aceleração no processo inflamatório que ocorre após lesão [37]·[38]·[39].

1.2 Junção Neuromuscular

A Junção neuromuscular (JNM) é uma sinapse específica do sistema nervoso periférico, formada pela conexão entre um axônio do neurônio motor inferior e a fibra muscular esquelética por ele innervada[40]. Morfologicamente, as JNMs são constituídas por três compartimentos: o compartimento pré-sináptico, onde estão presentes a terminação nervosa com as vesículas contendo acetilcolina (ACh), as células de Schwann e os kranócitos, células que ficam fora da lâmina basal sináptica, mas formam uma área de proteção sobre as JNMs durante o desenvolvimento pós-natal, sendo encontradas logo acima das células de Schwann [41]; o compartimento extracelular, preenchido pela lâmina basal; e o compartimento pós-sináptico, que compreende o sarcolema da fibra muscular com as dobras juncionais, onde em seu ápice se encontram os receptores de acetilcolina (AChRs), e o sarcoplasma que proporciona suporte estrutural e metabólico para a região pós-sináptica[42] (Figura 1).

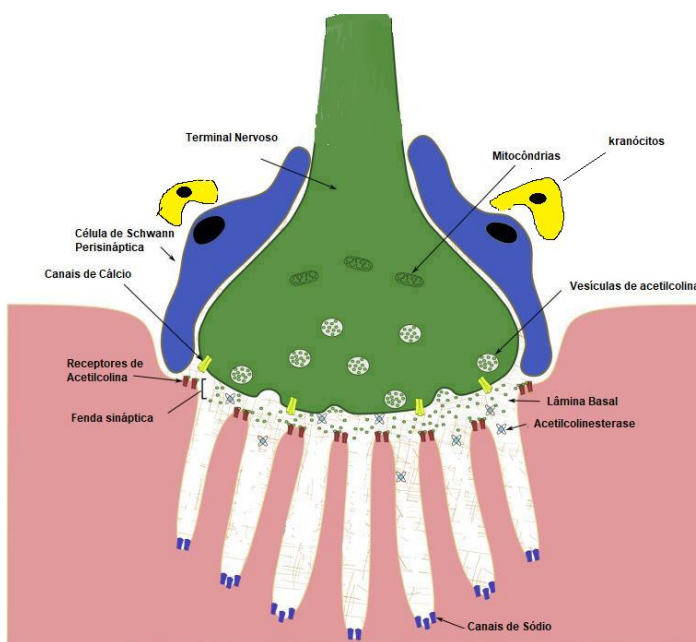


Figura 1: Esquema ilustrando os principais componentes das Junções Neuromusculares. Adaptado de Valdez, 2020[43].

Na JNM madura, cada fibra muscular tem conexão com apenas um axônio motor, entretanto, um neurônio motor inerva múltiplas fibras ao ramificar seu

axônio dentro do músculo alvo da inervação. Este grupo de fibras musculares innervadas por um único neurônio motor é o que constitui a chamada Unidade Motora[44]. As JNMs geralmente se localizam na área central das fibras musculares e estão dispostas em uma linha entre as fibras musculares próximas, ocupando na maioria das vezes uma área de 0,1% de toda fibra. Esse padrão característico de distribuição das JNMs em um músculo é chamado de banda motora[45][44].

No compartimento pré-sináptico, estão presentes o terminal nervoso e as células de Schwann, principais responsáveis pela plasticidade estrutural das JNMs e cujos prolongamentos recobrem este terminal protegendo-os de lesões químicas e mecânicas. As células de Schwann terminais ou perisinápticas, não mielinizantes, têm capacidade de detectar alterações na transmissão sináptica [46]. O terminal nervoso contém canais de sódio e potássio, mitocôndrias, retículo endoplasmático e vesículas sinápticas contendo ACh. Essas vesículas estão concentradas na zona ativa, área de espessamento da membrana do terminal nervoso, região com abundância de proteínas (dentre estas a família das SNAREs) e canais de Cálcio[46].

A fenda sináptica se situa entre a membrana pré-sináptica e pós-sináptica, é um espaço que contém a lâmina basal sináptica, a qual é contínua com a lâmina basal que envolve a fibra muscular[47]. Ainda na fenda sináptica se encontram diversas proteínas, entre elas: a Acetilcolinesterase (AChE), responsável pela degradação da ACh liberada para conter seu efeito sobre os AChRs; a Agrina, a laminina-4, a laminina-9, a laminina-11 e o colágeno IV, que tornam a fenda bioquimicamente especializada e importante para o desenvolvimento e funcionamento da JNM[48].

O compartimento pós-sináptico, também chamado de placa motora, é composto pela parte espessada da membrana muscular (sarcolema), sendo a mesma pregueada formando as dobras juncionais, depressões com cerca de 1 μm de profundidade que aumentam a superfície pós-sináptica e, portanto, a eficácia da transmissão sináptica. No ápice das dobras juncionais se encontram os AChRs, que são expressos pelos núcleos sinápticos também componentes do compartimento pós sináptico[47].

Os AChRs são canais iônicos de ligação transmembrana, compostos de cinco subunidades (2α , 1β , 1δ e 1ε)[49] (Figura 2), em forma de rosácea, organizada ao redor do poro central. Estes se distribuem de duas formas: uma forma extrajuncional imatura, presente na fibra embrionária ou na fibra desnervada, constituída pelas subunidades α 2, β , δ e γ (alfa, beta, delta e gama); e uma forma juncional madura, presente na JNM da fibra inervada e madura, consistindo das subunidades α 2, β , δ e ε (alfa, beta, delta e epsilon) [49].

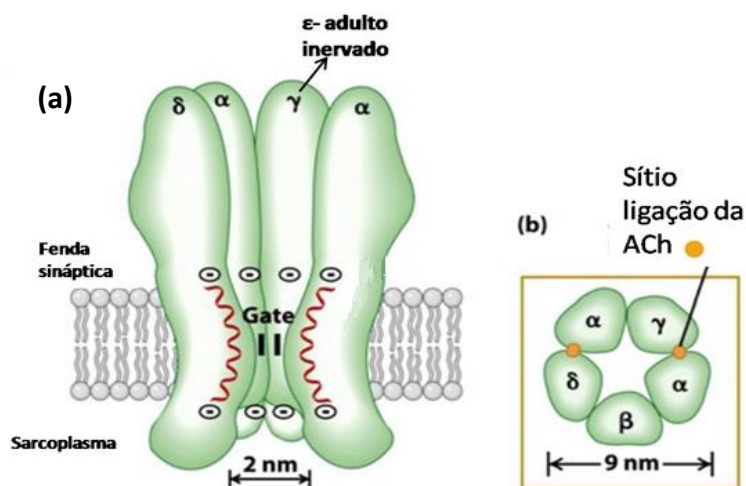


Figura 2: Representação das subunidades dos AChRs (a); em destaque ligação das moléculas de ACh com os AChRs (b). Adaptado de Lebbe et al, 2014[50].

Ainda no ápice também estão presentes outras proteínas como a Rapsina, a Utrofina e a α -distrobrevina-1. Já na base das dobras se encontram a α -dystrobrevina-2, a distrofina, as moléculas de N-CAM e os canais de Na^+ , desencadeadores de potenciais de ação na fibra muscular[46],[51].

Quando ocorre a chegada de um potencial de ação ao terminal nervoso, as vesículas sinápticas de ACh se fundem à membrana pré-sináptica através de um complexo composto pela união das vesículas de ACh com as proteínas SNARES. Essas proteínas são compostas por 100-300 aminoácidos, todas contendo um domínio α -hélice, responsável pela ligação com as vesículas de ACh, as mesmas são classificadas em Q ou R-SNAREs em relação ao resíduo (glutamina ou arginina,

respectivamente) que é altamente conservado em sua porção hidrofílica. Os Q-SNAREs são ainda subdivididos em Qa, Qb, Qc e Qb-c SNAREs, dependendo de sua localização e de como contribuem para a formação do complexo. Normalmente, quatro SNAREs (três diferentes Q-SNAREs e uma R-SNARE) compõem o complexo de fusão de membranas [52],[53]. Essas vesículas atingem a fenda sináptica e se ligam aos AChRs na membrana pós-sináptica. Essa ligação resulta na abertura dos canais catiônicos e na liberação de íons despolarizam a membrana causando um potencial de ação muscular, levando a contração das fibras musculares [54].

Durante a fase inicial de desenvolvimento, os AChRs estão distribuídos de forma uniforme pelo sarcolema, conforme o processo de desenvolvimento vai avançando, os AChRs se concentram nos chamados sítios sinápticos [55]. Quando nessa fase os potenciais de ação atingem o músculo, ocorre uma alteração da expressão gênica reprimindo a expressão dos fatores de regulação miogênica (MyoD, Myf5, miogenina e MRF4), da subunidade embrionária AChR γ e também AChR $\alpha 1$ e MuSK. A acetilcolina liberada na fenda sináptica aumenta a expressão das formas adulta dos AChRs ($\alpha 1$, β , δ e ϵ) e diminui a forma embrionária AChRs (γ)[54].

Em seu desenvolvimento pré-natal as JNMs são funcionalmente ativas, porém são necessárias semanas de maturação pós-natal para que essa sinapse atinja sua completa funcionalidade e plasticidade. Neste processo ocorre a eliminação sináptica, que irá propiciar a conexão de apenas um axônio motor para cada fibra muscular (situação recorrente para a maioria dos músculos estriados esqueléticos) e a troca das subunidades dos AChRs γ para ϵ [56]. Ainda nesse período, a JNM aumenta em tamanho e ocorre o desenvolvimento das dobras juncionais, invaginações na membrana pós-sináptica, passando de uma forma embrionária mais oval para o conhecido formato de placa em *pretzel*, devido ao arranjo característico em *clusters* dos AChRs [56]. Diversas proteínas estão envolvidas na formação dos *clusters* dos AChRs, dentre elas: a Agrina, LRP4, MuSK, Rapsina e Dok7 [55] (Figura 3).

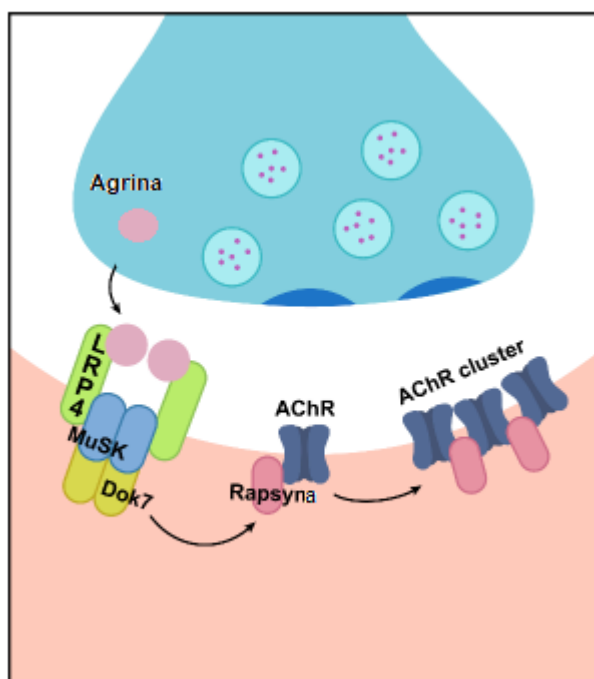


Figura 3: Formação e manutenção dos *clusters* de AChRs. Adaptado de Depew et al 2021[57].

Outro fator importante de ser apontado é que existe uma relação recíproca no nível de algumas destas proteínas com os AChRs. Diversos estudos comprovaram que na ausência ou redução destes receptores, foi encontrado um déficit em mesma proporção da proteína Rapsina [58][59].

Em uma JNM madura os *clusters* de AChRs costumam ser bastante estáveis, até que sejam removidos e direcionados para degradação, pelos lisossomos. Uma parte dessa população de receptores internalizados se recicla e volta ao mesmo sítio sináptico [60]. Portanto três diferentes populações de AChRs estão presentes nas JNM: os recém-sintetizados, os reciclados e os pré-existentis [60].

Sinais positivos e negativos também estão envolvidos na manutenção da estrutura da JNM, e dos *clusters* de AChRs [56]. O principal sinal positivo é a ligação que ocorre entre Agrina/LRP4/MuSK. Já como sinal negativo está a liberação de ACh, que ao se ligar nos sítios sinápticos, onde se encontram os AChRs, acabam por controlar sua disposição e quantidade [56].

As células de Schwann perisinápticas, não mielinizantes, além de atuar na formação, maturação e manutenção da sinapse neuromuscular, também atuam na

estabilização dos AChRs [61].

1.3- Proteínas envolvidas na estabilização e manutenção das JNM

1.3.1 Agrina

Proteína sintetizada principalmente pelo axônio motor, é um grande proteoglicano (>200 KDa) depositado após sua síntese na lâmina basal da fenda sináptica[62]. Atua principalmente na organização dos AChRs em *clusters* na fase inicial de desenvolvimento das JNMs e na manutenção e estabilidade dos mesmo nas JNMs maduras, se relacionando com dois receptores específicos da fibra muscular: o receptor ligado a proteína 4 (LRP4) e o receptor tirosina quinase do músculo esquelético (MuSK) [54].

Ainda que amplamente conhecida por sua atuação nas JNMs, a Agrina é expressa em diversos tecidos, com papéis associados a motilidade, diferenciação e proliferação celular [63]. Quando ocorre a ligação de duas moléculas de Agrina, com duas moléculas de LRP4 à 2 moléculas de MuSK, este último é ativado atuando na formação de *clusters* dos AChRs. A Agrina atua também na fosforilação da subunidade AChR- β , auxiliando no agrupamento e ancoragem dos AChRs em alta densidade na membrana pós-sináptica, fortalecendo o complexo Rapsina/AChRs [64]. Além de sua atuação direta junto aos *clusters* de AChRs, a Agrina se liga a uma rede de proteínas de matriz extracelular, contribuindo para estabilização e manutenção estrutural da sinapse como um todo [65]. Dentro desta rede é essencial a ligação da Agrina com moléculas de glicosaminoglicanos, contribuindo para a manutenção dos níveis da Agrina junto as JNM [66].

1.3.2 LRP4

O receptor ligado a proteína 4 (LRP4) é uma proteína transmembrana, de 220KDa, sintetizado pelas células musculares, pertencente a família das lipoproteínas de baixa densidade relacionada a receptores. O LRP4 é conhecido por

atuar na estabilização dos AChRs, sendo co-receptor da ligação entre a Agrina e o MuSK. Porém, estudos mostram que especificamente a região extracelular do LRP4 sozinha é capaz de promover a formação de clusters de AChRs [67].

O LRP4 atua também na diferenciação do terminal pré-sináptico[68]. Estudos utilizando camundongos *knock-out* para LRP4, observaram a morte dos animais logo ao nascimento devido a complicações respiratórias, resultante da não formação das JNMs, demonstrando a importância dessa proteína junto ao desenvolvimento e manutenção das JNMs [69],[70]. Além disso, o LRP4 atua no desenvolvimento dos membros [71], na organogênese craniofacial [72], na osteogênese [73], no desenvolvimento renal [74], no desenvolvimento do sistema nervoso central [75], assim como em funções cognitivas e na plasticidade [76]. Seu papel essencial e diverso, principalmente no sistema nervoso, levou a vários estudos que observaram relação entre a redução de LRP4 e doenças neurodegenerativas, dentre elas: a miastenia grave [77], a esclerose lateral amiotrófica [78] e o Alzheimer [79].

1.3.3 MuSK

O receptor tirosina quinase do músculo esquelético (MuSK) é uma proteína transmembrana de passagem única, de mais ou menos 140kDa, encontrada no sarcolema das fibras musculares e produzida no núcleo sináptico das JNMs [80]. Quando ligado a Agrina, o MuSK é fosforilado por intermédio da ligação de ambos com LRP4. Em sua forma fosforilada permite a ligação da proteína Dok-7 e sinaliza para a formação dos *clusters* dos AChRs, através do envio de sinal para atuação da Rapsina que funciona como um andaime para os receptores de ACh [56]. A fosforilação do MuSK influencia também no desenvolvimento da zona ativa presente na membrana pré-sináptica [81].

O MuSK está presente em outros tecidos além da musculatura estriada esquelética, como no cérebro, fígado, pulmão, além de linhagens de células cancerígenas[82]-[81]. Assim como a Agrina e o LRP4, em estudos com animais geneticamente modificados, observou-se que a ausência de MuSK é incompatível com a vida, devido a não formação das JNMs e subsequente falência respiratória

[83].

1.3.4 DOK7

O DOK7 é um adaptador proteico citoplasmático, sintetizado pelo músculo estriado esquelético[44], que atua principalmente na ativação do MuSK para sinalização da formação e estabilidade dos *clusters* de ACh [56]. Após ligação com MuSK, o DOK7 se liga a uma molécula de PY553, levando assim a ativação completa do MuSK, fazendo com que este aumente sua dimerização, ativando a cascata molecular, a partir do MuSK, para sinalização da Rapsina [81]. Estudos mostram a importância do DOK7 na manutenção e estabilidade da JNM, já que na falta de Agrina, há aumento nos níveis de DOK7, que garante a ativação completa do MuSK e a formação dos clusters de AChRs[84]

1.3.5 Rapsina

A Rapsina, receptor associado a ancoragem das proteínas da sinapse, é uma proteína estrutural citoplásmica ligada a membrana das fibras musculares, com massa aproximada de 43kDa e que atua na formação dos *clusters* de AChRs, unindo as subunidades dos receptores às proteínas do citoesqueleto [85]. Essa proteína serve como um andaime para apoio e agrupamento destes receptores, sendo que a sua ligação com os AChRs ocorre após a fosforilação do MuSK, embora a via completa de ativação não tenha sido totalmente decifrada [86].

A Rapsina também interage com proteínas do citoesqueleto que são essenciais para o agrupamento dos AChRs, como o complexo distrofina-glicoproteína (CDG) [87]. Além disso, a Rapsina se une a outras moléculas estruturais musculares na formação e manutenção das JNMs [88].

Foi descrito ainda que a proteína Rapsina trata-se na realidade de uma enzima, que *in vitro*, é capaz de catalisar tanto a ubiquitinação como a nedilação (proteína que realiza processo análogo a ubiquinização-proteína ned) [89].

1.4 JNMs e as lesões nervosas periféricas

Após as lesões nervosas periféricas e a consequente desnervação, ocorre em geral a degeneração das JNMs. Essa degeneração está relacionada ao tempo de desnervação [90]·[91], que se muito longo acaba resultando na atrofia e degeneração de fibras musculares. Mesmo havendo a reinervação de algumas JNMs pode não haver recuperação de sua função [92], esta pode ser uma das principais causas da recuperação funcional incompleta após esse tipo de injúria [91].

Decorrido uma semana da lesão, *clusters* de AChRs começam a se dispersar nos sítios sinápticos [93]·[94]. Após a desnervação, é comum a presença de placas motoras poli inervadas, ou seja, com mais de um axônio motor chegando a mesma fibra muscular [95].

Ocorrem ainda, alterações morfológicas nas JNMs após desnervação, havendo aumento na fragmentação, com alteração no padrão de distribuição dos *clusters* de AChRs, de braços contínuos para o padrão em ilha [96], além de aumento na área da placa motora [97]. No compartimento pré-sináptico há desestabilização do terminal nervoso e emissão de ramificações irregulares [98]. Quando a JNM está desnervada, o AChR- ϵ (forma madura) é substituído pelo AChR- γ (forma imatura), alterando a transmissão do sinal elétrico e, portanto, a contração muscular, levando a atrofia das fibras [99].

Acompanhando a dispersão e aumento nos níveis dos AChRs, há também aumento dos fatores de regulação miogênica: MyoD e miogenina, genes que atuam na regeneração muscular a partir da ativação das células satélites. Em ratos este padrão dura de 3 a 4 semanas, havendo então uma redução na expressão dos AChRs [100]. Durante a desnervação a longo prazo, porém, pode ocorrer queda no número de células de satélite, inviabilizando a regeneração muscular, e o aumento em consequência da degradação proteica muscular, com expressão elevada de genes ligados a via da ubiquitina-proteassoma, como a atrogina-1 e o MURF1[101].

As células de Schwann perisinápticas participam também da remodelação

das JNMs após lesão nervosa, atuando como guia para reinervação axonal [102]. Assumem também um papel fagocítico, removendo o material celular danificado, a fim de limpar a área pré-sináptica e facilitar a regeneração [103]. De forma similar, atuam os kranócitos, células que se colocam com as células de Schwann terminais no compartimento pré-sináptico e que, rapidamente após a desnervação iniciam um processo de proliferação e formação de uma ponte para direcionar a regeneração das fibras musculares [41].

A regeneração morfológica do nervo e do músculo não está associada a uma recuperação funcional. Ainda que haja regeneração axonal, com as JNMs em aparência morfológica normal, a falha na ativação elétrica muscular persiste[91], demonstrando a importância no entendimento da resposta das JNMs frente a este tipo de lesão.

1.5 Justificativa

Considerando os severos efeitos que as lesões nervosas periféricas causam na vida dos pacientes acometidos e o número de lesões graves que não podem ser tratadas através da conexão dos cotos via sutura, é importante buscar alternativas que promovam uma adequada regeneração. Esses métodos alternativos não devem causar danos secundários, como os que ocorrem após a técnica de enxerto. Além disso, é importante que sejam capazes de acelerar e, portanto, potencializar a regeneração nervosa após esse tipo de lesão. O uso do biopolímero de fibrina atende a essas expectativas, visto que tem sido considerado como um fator protetor e até mesmo trófico no ambiente da lesão, como demonstrado em trabalhos anteriores publicados por nosso grupo e por outros autores [104],[105],[106],[107]. Por último, a busca do melhor entendimento da resposta das JNMs e do ambiente molecular que as envolve frente a lesões graves que acometem os nervos, pode contribuir para compreensão de outras patologias neurodegenerativas [40].

1.6 Objetivo

Avaliar a associação do biopolímero de fibrina à tubulização na reconstrução nervosa após lesão nervosa periférica: com foco nas JNMs e proteínas associadas.

1.6.1 Objetivos específicos:

- Análise funcional da marcha através do CatWalk;
- Análise morfológica e morfométrica dos AChRs através da microscopia confocal de varredura a laser;
- Análise morfológica e morfométrica do nervo isquiático.
- Quantificação proteica dos AChRs: alpha (contém sítio de ligação para ACh), gama (receptor embrionário e desnervado) e épsilon (receptor adulto e innervado), das células de Schwann (S100) e das proteínas associadas aos AChRs: Agrina, LRP4, MuSK, Rapsina. Os MRFs: MyoD e Miogenina. Os Atrogenes: Atrogina 1 e MURF1. E a metaloproteinase que controla os níveis de Agrina(MMP3).

2 Materiais e Métodos

Foram utilizados 52 ratos *Wistar* adultos (90 dias) machos, provenientes do Biotério Central da UNESP, com peso médio entre 300 – 400g (CEUA FMB 1244/2017). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e de fotoperíodo (12h:12h).

2.1 Preparação das próteses para tubulização

A policaprolactona (PCL) foi o polímero escolhido, pois trata-se de material já aprovado por algumas agências regulatórias, para uso em reparo nervoso, além de ser transparente e flexível, facilitando o processo cirúrgico[108].

As membranas foram preparadas a partir de PCL 5 % (m/v) pelo método de evaporação de solvente. O PCL foi dissolvido em clorofórmio (Merck, Alemanha) e mantido sob agitação por 12 horas para dissolução completa do polímero. Após

12h, a solução de PCL foi colocada em moldes de vidro dentro de uma cuba também de vidro, em atmosfera saturada pelo solvente para evaporação do mesmo e obtenção das membranas. As membranas foram em seguida moldadas com auxílio de suportes de 1,6 mm [109], as paredes vedadas com uso de adesivo cirúrgico, DERMABOND* HIGH VISCOSITY, o qual é amplamente utilizado na área médica, e tem sua composição a base de 2-octil-cianoacrilato [110], e cortadas com 12 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro.

OBS: as membranas foram desenvolvidas em parceria com o Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais do Departamento de Engenharia de Manufatura e Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica – UNICAMP.

2.2 Procedimento cirúrgico

Antes do procedimento cirúrgico os animais receberam de forma subcutânea a aplicação de enrofloxacino (antibiótico- na dose de 10 mg/kg-30 minutos antes), o qual foi administrado em dose única, a fim de evitar possíveis infecções advindas do procedimento cirúrgico. Em seguida, os ratos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina (Dopalen – 90mg/kg) e Xilazina (Rompun – 10mg/kg) e aleatoriamente distribuídos em 4 grupos experimentais:

1-Controle-Sham (S); 2-Controle Desnervado (D); 3- Tubulização (PCL); 4- Tubulização + Biopolímero de Fibrina (FB).

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, aplicado lidocaína no local onde seria realizado a incisão, que foi realizada sobre a face lateral da coxa desde a altura do trocânter maior até o joelho para possibilitar a exposição dos nervos isquiáticos direitos. Nos três dias consecutivos a técnica cirúrgica, o protocolo analgésico contemplou um anti-inflamatório não esteroide, cetoprofeno (5mg/kg, subcutâneo, uma vez por dia, no período de 3-5 dias), mais um opioide, tramadol (5 mg/kg), via subcutânea a cada 8-12 horas por 3-5 dias, conforme sinais de dor. Além disso, foi

utilizado rifocina spray (uso tópico) durante o período de cicatrização no local da incisão.

Nos animais do grupo Controle Desnervado (D), Tubulização (PCL) e Tubulização + Biopolímero de Fibrina (FB), de forma padronizada, a cerca de 3mm proximal a emergência da trifurcação do nervo isquiático, foi realizada uma lesão nervosa por transecção completa do nervo, sendo removido um fragmento de 8 mm do nervo isquiático. Após neurotmeze no grupo D, os cotos proximais e distais (Figura 4-B) foram invertidos em 180 graus e fixados a tela subcutânea adjacente, com pontos simples com fio de nylon Mononylon 10-0, PolySuture. Nos grupos PCL e FB, imediatamente após a lesão, os cotos nervosos foram inseridos e fixados na prótese tubular com uso de fio de sutura de nylon Mononylon 10-0, PolySuture (Figura 4-C). No grupo FB após a fixação dos cotos, 500µL do biopolímero de fibrina, gentilmente cedido pelo CEVAP, Brasil, cujos componentes e fórmula de aplicação constam das suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360), foi aplicado no tubo com auxílio de duas seringas (Figura 4-D), a fim de que os componentes do biopolímero apenas se encontrassem no interior do tubo para então ocorrer a formação de um coágulo. No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e então aplicados [111].

Após a realização da reconstrução, os tecidos moles foram suturados com pontos simples com poliéster siliconado nº 5, os animais ficaram sob aquecimento até a recuperação. Nos animais do grupo S (controle Sham) foi apenas realizada a localização e debridação do nervo isquiático, sendo em seguida a pele suturada (Figura-A).

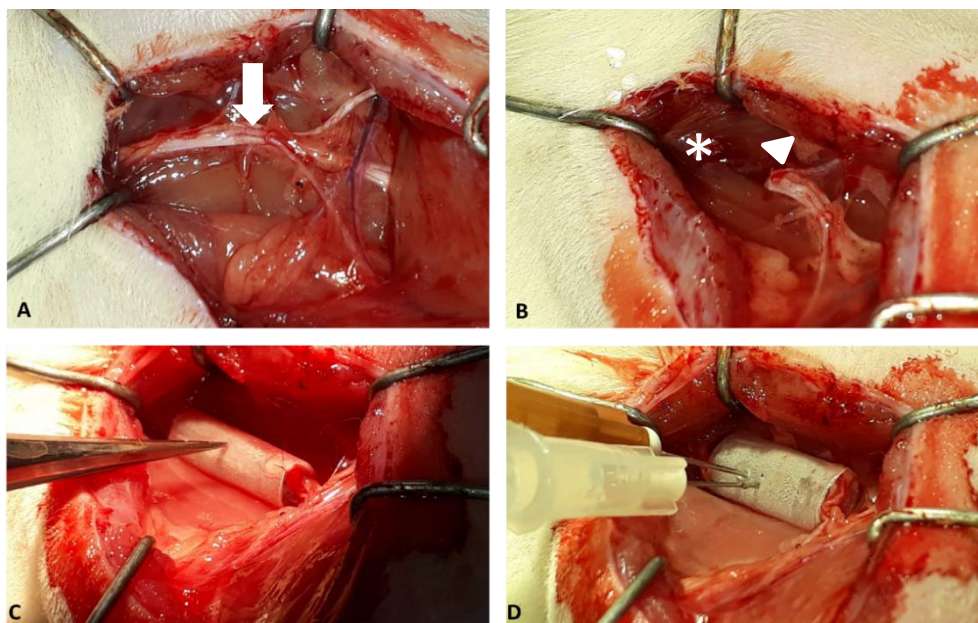


Figura 4: Fotografias das técnicas cirúrgicas utilizadas em todos os grupos experimentais. A- Localização do nervo isquiático; seta-trifurcação do nervo isquiático. B- Neurotome do Nervo Isquiático, deixando gap de 8mm; asterisco- coto proximal; cabeça de seta- coto distal. C-Fixação dos cotos nervosos ao tubo de PCL (policaprolactona). D- Detalhe da inserção dos componentes do biopolímero de fibrina ao tubo de PCL.

Antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, e quinzenalmente após a secção e reparo nervoso, foi realizada análise no Catwalk de todos os animais de acordo com os grupos experimentais.

Decorridos o período experimental (90 dias), todos os animais foram pesados e anestesiados através de injeção intraperitoneal de Ketamina (Dopalen – 90mg/kg) e Xilazina (Rompun – 10mg/kg) e em seguida eutanasiados com tiopental sódico (120 mg/kg) para as análises morfológica e morfométrica do nervo isquiático e para análise da expressão proteica via Western Blot. Para a análise dos AChRs via microscopia confocal (5 animais de cada grupo) após anestesia foi realizada perfusão intracardíaca, a seguir os músculos sóleos direitos e os nervos isquiáticos direitos foram então coletados, fixados e adequadamente armazenados. Os

músculos sóleos foram também pesados, e posteriormente foi realizado cálculo do peso relativo.

OBS: O músculo sóleo foi selecionado para os estudos considerando que se trata de um músculo postural, innervado por ramos do nervo isquiático, cuja importância está associada a manutenção da estabilidade e progressão do corpo à frente durante as várias fases da marcha[112].

2.3 Avaliação da Marcha através do aparelho "Catwalk" (N = 13)

O Catwalk trata-se de um sistema de análise automatizado da marcha, no qual os animais foram colocados para andar em uma plataforma de vidro iluminada, onde o contato da pata com a superfície do vidro resulta em uma imagem nítida e brilhante da pegada. A plataforma de vidro foi equipada com uma câmera de vídeo colocada sob a plataforma e ligada a um computador com um software de aquisição de vídeo e análise das pegadas. Onde a intensidade do sinal depende da área da pata em contato com a plataforma e aumenta com a pressão aplicada pela pata.

Inicialmente os animais foram treinados (uma ou duas vezes) a caminhar no dispositivo (Catwalk XT 9.1-Noldus (Unipex/FMB-Botucatu)) utilizado para avaliação da marcha. O estudo se baseou nas pegadas e marcha do animal, de forma estática e dinâmica, baseadas em duração, orientação e coordenação dos movimentos entre as patas, sendo realizadas 3 corridas para cada animal em cada momento experimental (pré-operatório, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após cirurgia).

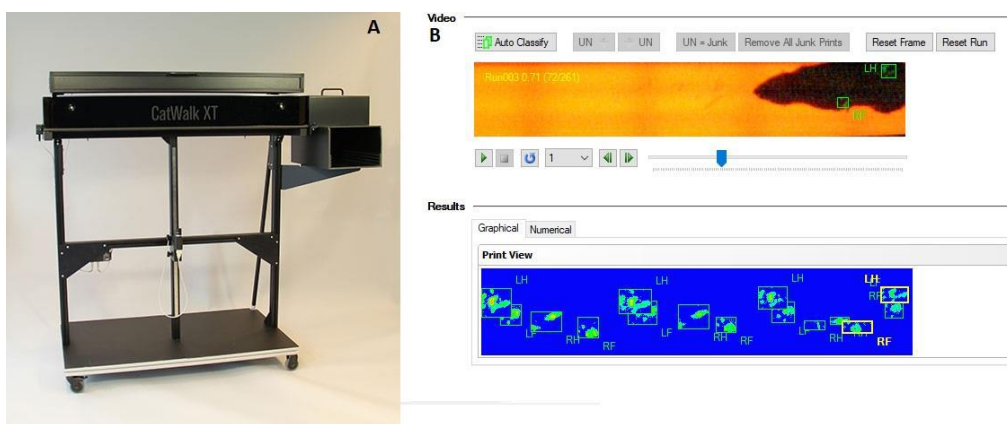


Figura 5: A- Plataforma Catwalk com câmera acoplada (www.noldus.com/Catwalk-XT/specifications). B- *Print Screen* das análises realizadas junto ao software.

Os critérios adotados para que uma caminhada fosse considerada adequada para o experimento foram:

- 1- Que a caminhada durasse ao menos 0,50 segundos.
- 2-Que a caminhada não excedesse 15 segundos em tempo.
- 3- Que o número mínimo de pegadas fosse de quatro, completas.
- 4- A variação na velocidade permitida foi de 60%.

Os parâmetros avaliados foram:

- 1- Índice funcional do fibular.
- 2-"Stand"- fase de apoio ou duração do contato da pata com o vidro.
- 3- Intensidade máxima do contato máximo.
- 4- Área da pegada.
- 5-Duração média das corridas

Para o cálculo do índice funcional do fibular, os dados obtidos no catwalk foram utilizados na seguinte fórmula: $IFF = 174.9 ((ETS - NTS) / NTS) + 80.3 \times ((EPL - NPL) / NPL) - 13.4$. Onde E se refere ao lado lesionado e N ao lado não lesionado, a sigla TS se refere a distância entre o primeiro e o quinto dedos (*toe spread*) e a sigla PL a distância entre o terceiro dedo e o calcanhar (*print length*) [113].

Para a obtenção de resultados de forma mais precisa, após as médias das 3 corridas realizadas em cada tempo por cada animal de cada grupo, todos os resultados foram representados utilizando uma razão dos valores da pata ipsilateral pela pata contralateral, já que normalmente pode haver compensação durante a caminhada.

2.4 Microscopia Confocal para AChRs (N=5)

Em cinco animais de cada grupo experimental, previamente pesados e anestesiados (Ketamina (Dopalen 90mg/Kg) e Xilazina (Rompum-10mg/Kg)) via intraperitoneal, foi realizada perfusão intracardiaca, via ventrículo esquerdo com bomba dosadora peristáltica Milan®, inicialmente com PBS 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.

Após perfusão e redução dos músculos sóleos ao terço médio, eles foram seccionados longitudinalmente e, em seguida, foi realizado protocolo para marcação dos AChRs com α -bungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTX – Molecular Probes T1175, 1: 1000 em PBS). Os cortes foram montados em lâmina sob lamínula em meio de montagem Dabco®-1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane solution (Sigma 290734), para posterior observação ao microscópio confocal de Varredura a Laser (Leica®-TCS-SP5) junto ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Os parâmetros básicos utilizados para a captura das imagens no microscópio confocal foi de um μm de intervalo, zoom de dois e aumento de 63x, com a finalidade de capturar a imagem da placa motora de forma mais individualizada possível, facilitando assim sua posterior análise.

2.5 Análise dos AChRs utilizando o plugin “NMJ morph” *¹

As análises foram realizadas usando o software Image J[114], seguindo a sequência específica e as ferramentas do plugin “NMJ morph”[115], para uma análise robusta e confiável das JNMs. Foram analisadas em torno de 50 imagens de cada animal, 250 por grupo totalizando o valor aproximado de 1000 imagens. Os parâmetros avaliados foram: área e perímetro dos AChRs; diâmetro, área e perímetro da placa motora; índice de compactação; número e área média dos *clusters* de AChRs, e sua fragmentação. Inicialmente, as imagens que estavam em máxima projeção, foram convertidas para formato binário (Figura 6).

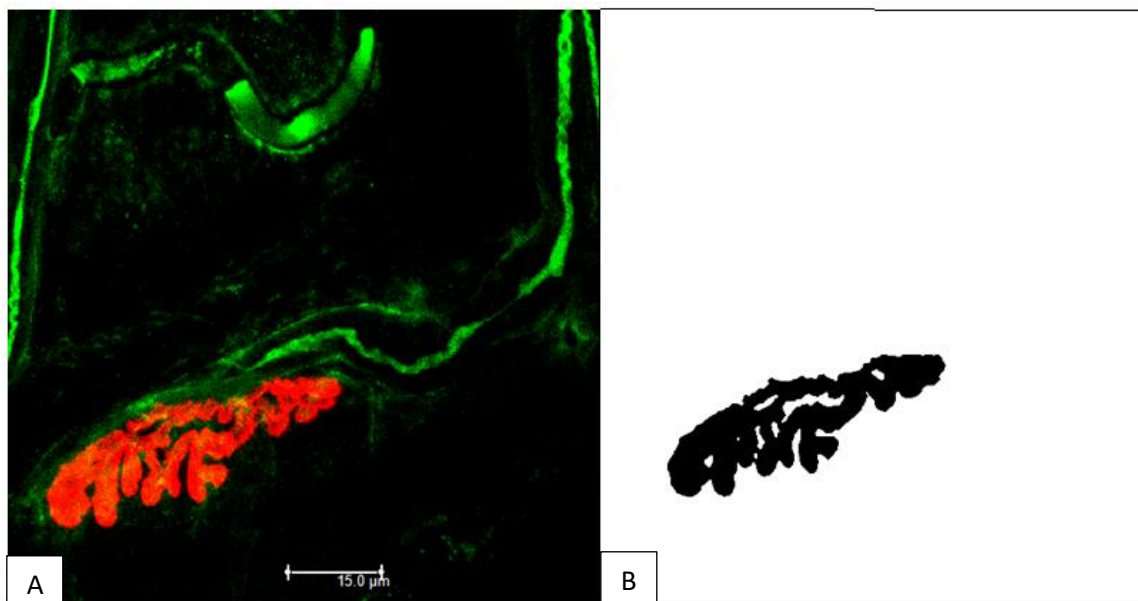


Figura 6: *Print screen* da JNM (terminal nervoso-verde + placa motora-vermelho) em resolução máxima (A) e convertida em formato binário-preto e branco (B).

¹ *Estas análises foram realizadas junto à Universidade de Edimburgo decorrente de bolsa de doutorado sanduíche obtida junto ao programa de Cirurgia e Medicina Translacional pelo edital PDSE (2019).

Em seguida os parâmetros foram analisados na seguinte ordem: (Figuras 7,8 e 9)

- Área e perímetro dos AChRs:

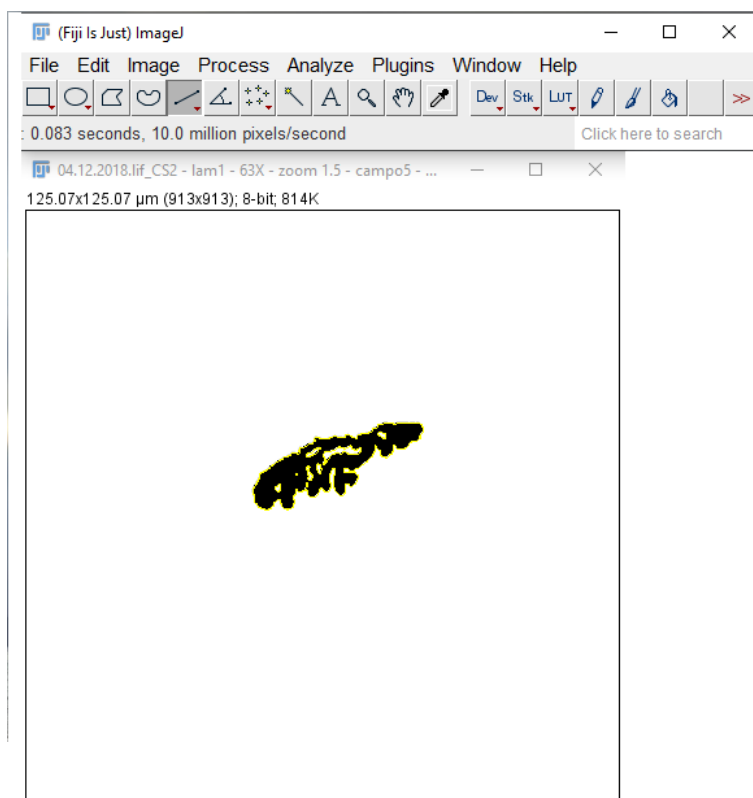


Figura 7: Print screen mostrando seleção para obtenção dos valores referentes a área e perímetro dos AChRs.

- **Diâmetro, área e perímetro da placa motora** (análise que engloba não só os AChRs, mas a área toda em que se distribuem, totalizando todo o compartimento pós-sináptico ou placa motora).

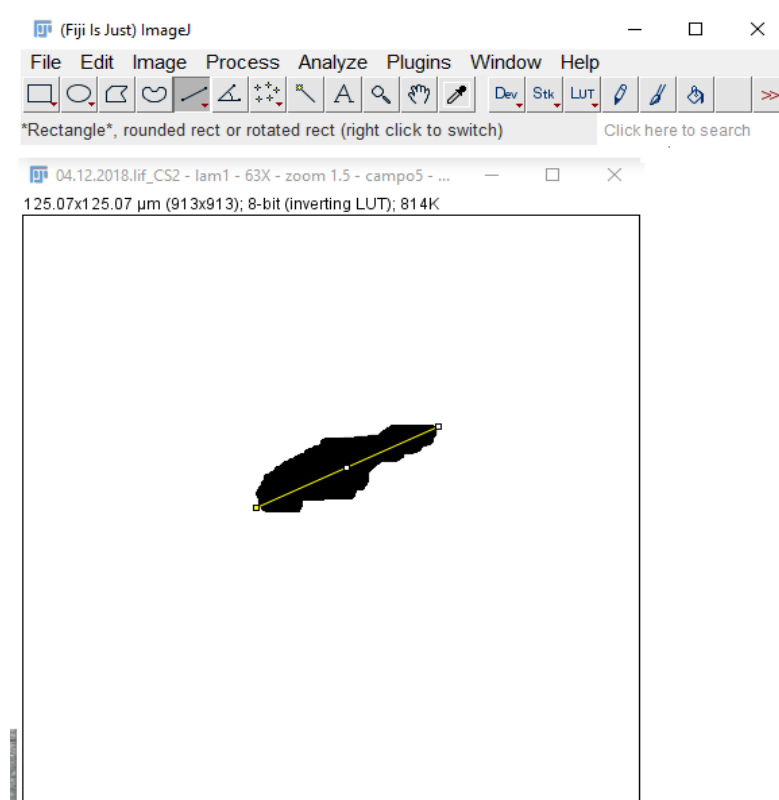


Figura 8: Print screen mostrando análise manual do diâmetro da placa motora, a partir da mesma imagem é possível selecionar toda a placa motora, para obtenção dos valores referentes a área e perímetro da placa motora.

Índice de compactação:

(Área dos AChRs/área da placa motora) *100.

-Número dos *clusters* de AChRs

Para essa análise o número dos *clusters* formados pelos AChRs foi contabilizado manualmente e com segurança, devido à ferramenta de segmentação de partículas aplicada a imagem que separa os *clusters*, facilitando a contagem.

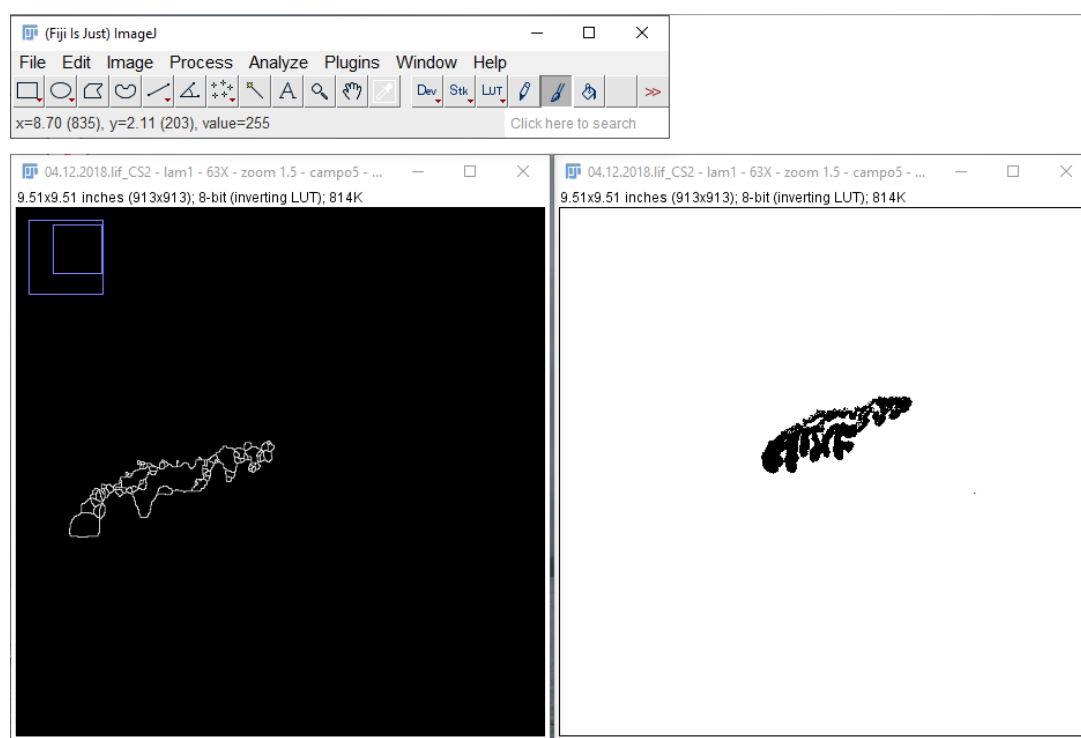


Figura 9: Print Screen mostrando os *clusters* de acetilcolina, após o uso da ferramenta que torna as partículas segmentadas, facilitando a contagem, na imagem há apenas 1 *cluster* dos AChRs.

-Área média dos *clusters* de AChRs

Essa análise leva em consideração a distribuição dos AChRs, cujo valor foi obtido através da razão entre a área dos AChRs pelo número de *clusters* em que se organizam.

- Índice de Fragmentação:

A partir do número de *clusters* de AChRs, foi possível calcular o índice de fragmentação. Sendo considerado o valor zero (0), para um *cluster* de AChRs e quanto maior for o número de *clusters* formado mais próximo de (1) será o valor.

$1 - (1 / \text{número de Clusters de AChRs})$.

2.6-Análise morfológica e morfométrica do nervo isquiático (n=5)

Os nervos isquiáticos foram expostos e removido um fragmento de cerca de 3 mm (correspondente à área presente no interior do tudo) que foi submerso em solução de tetróxido de ósmio a 1%, utilizado como fixador e corante da bainha de mielina. Em seguida, os fragmentos foram processados seguindo rotina para inclusão em historesina. Foram obtidas secções transversais dos nervos e coradas com azul de toluidina para melhor observação dos núcleos das células inflamatórias e da matriz extracelular. Após obtenção das fotomicrografias foi realizada análise morfométrica através do software livre Image J [114] dos seguintes parâmetros: número de axônios e de fibras nervosas, área, diâmetro e perímetro do axônio e da fibra nervosa, área e perímetro do fragmento nervoso. A partir dos valores obtidos, foi calculado através das fórmulas abaixo: o diâmetro médio dos axônios e das fibras, a espessura da bainha de mielina e a razão G.

$$\text{Diâmetro médio axônios} = \frac{\sum \text{diâmetro axônios}}{n^{\circ} \text{ axônios}}$$

$$\text{Diâmetro médio fibras} = \frac{\sum \text{diâmetro fibras}}{n^{\circ} \text{ fibras}}$$

$$\text{Espessura da bainha mielina} = \frac{\text{diâmetro da fibra} - \text{diâmetro do axônio}}{2}$$

$$\text{Razão G} = \frac{\text{diâmetro do axônio (média)}}{\text{diâmetro da fibra (média)}}$$

A quantificação das fibras nervosas e dos axônios foi calculada a partir da somatória do número dos mesmos obtidos em 5 campos aleatórios em objetiva de 100x. A estimativa do número de fibras nervosas e de axônios em cada nervo foi calculada segunda a fórmula:

$$\text{Estimativa Número Total de Axônios} = \frac{\Sigma \text{ número de axônios} \times 100}{5 \text{ (porcentagem da amostra)}}$$

2.7- Análise da expressão proteica por Western Blotting (N=8)

Amostras dos músculos sóleo coletadas de oito animais de cada grupo foram utilizadas. As amostras de tecido foram homogeneizadas em RIPA com inibidores de proteases (30mg de tecido/100µl de tampão de extração). Os extratos dos tecidos foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. O conteúdo proteico foi determinado pelo método de Bradford (Bio-Rad protein assay) e o correspondente a 30 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de poliacrilamida. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose, as quais foram posteriormente incubadas com os anticorpos primários: dos AChRs alpha (1:200- santa cruz- sc-136130), gama (1:1000-santa cruz- sc-13998) e épsilon (1:2000-santa cruz- sc-376747); da proteínas associadas a formação dos clusters dos AChRs: agrina (1:1000- abcam- ab12362), LRP4 (1:1000- abcam- ab174637), MuSK (1:1000- Bioss- bs6473R), Rapsina (1:1000- santa cruz- sc-58585); a metaloproteinase 3 (MMP3) que controla os níveis de agrina (1:1000- abcam- ab52915); o marcador de células de Schwann- S100 (1:1000- abcam- ab4066); os MRFs : MyoD (1:1000- santa cruz- sc-377460) e Miogenina (1:1000- sigma- M5815) e os atrogenes: atrogina-1 (1:1000- santa cruz- sc-166806) e MURF1 (1:1000- santa cruz- sc-398608). Após lavagem, as membranas foram incubadas por 1 hora em anticorpo secundário HRP e reveladas utilizando-se substrato quimioluminescente para Western Blotting (AMERSHAM ECLTM PRIME, GE Healthcare). A análise semiquantitativa de densitometria das

bandas foi realizada através do uso do software Image J[114]. Os dados foram normalizados usando os valores de GAPDH (1:5000- Cell Signaling - 14C10).

2.8-Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, sendo que foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Para as análises de: peso dos animais, peso do músculo e peso relativo; área, perímetro e diâmetro médio das fibras nervosas e axônios; área e perímetro do nervo; espessura da bainha de mielina e Razão G; quantificação das proteínas (S100, AChR α 1 e AChR γ , AChR ϵ , Musk, Rapsina e MURF1); área e perímetro dos AChRs; diâmetro, área e perímetro da placa motora; índice de compactação; número e área média dos clusters de AChRs e sua fragmentação, foi utilizada técnica para análise de variância para o modelo com um fator complementado com teste de comparações múltiplas de Tukey[116]. Para as análises referentes ao Catwalk para tempos fixados e para comparação entre os grupos foi utilizada técnica para análise de variância multivariada, para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes complementada com o teste de comparação múltiplas de Bonferroni[117]. Para o número de axônios e fibras nervosas e a quantificação proteica da Agrina, LRP4, MyoD, Miogenina, Atrogina-1 e MMP3 foi utilizada análise não paramétrica com teste Kruskal Wallis com comparação múltipla de Dunn[116].

Referências

- [1] Narayan SK, Arumugam M, Chittoria R. Outcome of human peripheral nerve repair interventions using conduits: a systematic review. *Journal of the Neurological Sciences* 2019;396:18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.10.012>.
- [2] Telich-Tarriba JE, De la Maza-Krzeptowsky LC, Cárdenas-Mejía A. Lesiones nerviosas en extremidad pélvica y su manejo en un centro de referencia en la Ciudad de México. *Cirugía y Cirujanos* 2021;89. <https://doi.org/10.24875/ciru.20000211>.
- [3] Kouyoumdjian JA. Peripheral nerve injuries: A retrospective survey of 456 cases. *Muscle & Nerve* 2006;34:785–8. <https://doi.org/10.1002/mus.20624>.
- [4] Grinsell D, Keating CP. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *BioMed Research International* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/698256>.
- [5] Calciolari S, González-Ortiz LG, Mongelli F, Cantini L, Capdevila X, la Regina D, et al. Identification and economic burden of main adverse events of nerve injuries caused by regional anesthesia: a systematic review. *Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2021.02.043>.
- [6] Dip F, Aleman R, Socolovsky M, Villalba N, Falco J, Menzo E Lo, et al. Nerve spectroscopy: understanding peripheral nerve autofluorescence through photodynamics. *Surgical Endoscopy* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00464-020-08227-7>.
- [7] Seddon HJ. A classification of nerve injuries. *British Medical Journal* 1942;2:237. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4260.237>.
- [8] Sunderland SS. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle & Nerve* 1990;13:771–84. <https://doi.org/10.1002/mus.880130903>.
- [9] Chandran V, Coppola G, Nawabi H, Omura T, Versano R, Huebner EA, et al. A Systems-Level Analysis of the Peripheral Nerve Intrinsic Axonal Growth Program. *Neuron* 2016;89:956–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.034>.
- [10] Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. Macrophages and tissue injury: Agents of defense or destruction? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2011;51:267–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105812>.
- [11] Zhao Y, Wang Y, Gong J, Yang L, Niu C, Ni X, et al. Chitosan degradation products facilitate peripheral nerve regeneration by improving macrophage-constructed microenvironments. *Biomaterials* 2017;134:64–77. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.026>.
- [12] Echeverry S, Wu Y, Zhang J. Selectively reducing cytokine/chemokine expressing macrophages in injured nerves impairs the development of neuropathic pain. *Experimental Neurology* 2013;240:205–18. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.11.013>.
- [13] Cheng Z, Zhang Y, Tian Y, Chen Y, Ding F, Wu H, et al. Cyr61 promotes Schwann cell proliferation and migration via $\alpha\beta 3$ integrin. *BMC Molecular and Cell Biology* 2021;22:21. <https://doi.org/10.1186/s12860-021-00360-y>.
- [14] Yi S, Liu Q, Wang X, Qian T, Wang H, Zha G, et al. Tau modulates Schwann cell

- proliferation, migration and differentiation following peripheral nerve injury. *Journal of Cell Science* 2019;132. <https://doi.org/10.1242/jcs.222059>.
- [15] Scheib J, Höke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nature Reviews Neurology* 2013;9:668–76. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.227>.
 - [16] Cattin AL, Lloyd AC. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 2016;39:38–46. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.005>.
 - [17] Rigoni M, Negro S. Signals Orchestrating Peripheral Nerve Repair. *Cells* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/cells9081768>.
 - [18] Lundborg G, Rosén B. Hand function after nerve repair. *Acta Physiologica* 2007;189:207–17. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01653.x>.
 - [19] Kemp SWP, Cederna PS, Midha R. Comparative outcome measures in peripheral regeneration studies. *Experimental Neurology* 2017;287:348–57. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.04.011>.
 - [20] Wang VC, Mullally WJ. Pain Neurology. *American Journal of Medicine* 2020;133:273–80. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.07.029>.
 - [21] Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8 Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair. *International Review of Neurobiology* 2009;87:141–72. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)87008-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)87008-6).
 - [22] Kubiak CA, Kung TA, Brown DL, Cederna PS, Kemp SWP. State-of-The-Art techniques in treating peripheral nerve injury. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2018;141:702–10. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000004121>.
 - [23] Beris A, Gkias I, Gelalis I, Papadopoulos D, Kostas-Agnantis I. Current concepts in peripheral nerve surgery. *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology* 2019;29:263–9. <https://doi.org/10.1007/s00590-018-2344-2>.
 - [24] Christopher P. Bellaire, BA, Dani C. Inglesby, MD, Naoum Fares Marayati B, Andrew J. Warburton, BS, and Eitan Melamed M. Trends in Peripheral Nerve Epidemiology and Reconstruction A State Database Study of Direct Repairs, Grafts, and Conduits. *Annals of Plastic Surgery* n.d. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000002823>.
 - [25] Vijayavenkataraman S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomaterialia* 2020;106:54–69. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.003>.
 - [26] Schutgens EM, Tryfonidou MA, Smit TH, Cumhur Öner F, Krouwels A, Ito K, et al. Biomaterials for intervertebral disc regeneration: Past performance and possible future strategies. *European Cells and Materials* 2015;30:210–31. <https://doi.org/10.22203/eCM.v030a15>.
 - [27] Boni R, Ali A, Shavandi A, Clarkson AN. Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering. *Journal of Biomedical Science* 2018;25. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0491-8>.
 - [28] Li R, Liu Z, Pan Y, Chen L, Zhang Z, Lu L. Peripheral Nerve Injuries Treatment: A Systematic Review. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2014;68:449–54. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9742-1>.
 - [29] Wilcox M, Gregory H, Powell R, Quick TJ, Phillips JB. Strategies for Peripheral Nerve Repair. *Current Tissue Microenvironment Reports* 2020;1:49–59. <https://doi.org/10.1007/s43152-020-00002-z>.
 - [30] Rodríguez Sánchez DN, de Lima Resende LA, Boff Araujo Pinto G, de Carvalho

- Bovolato AL, Possebon FS, Deffune E, et al. Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Enhance Neuroregeneration in a Rat Model of Sciatic Nerve Crush Injury. *Cell Transplantation* 2019;28:47–54. <https://doi.org/10.1177/0963689718809045>.
- [31] Moattari M, Kouchesfehiani HM, Kaka G, Sadraie SH, Naghdi M. Evaluation of nerve growth factor (NGF) treated mesenchymal stem cells for recovery in neurotmesis model of peripheral nerve injury. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2018;46:898–904. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.03.015>.
- [32] Eggers R, de Winter F, Tannemaat MR, Malessy MJA, Verhaagen J. GDNF Gene Therapy to Repair the Injured Peripheral Nerve. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.583184>.
- [33] Félix SP, Pereira Lopes FR, Marques SA, Martinez AMB. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. *Microsurgery* 2013;33:468–77. <https://doi.org/10.1002/micr.22109>.
- [34] Spotnitz WD. Fibrin sealant: Past, present, and future: A brief review. *World Journal of Surgery* 2010;34:632–4. <https://doi.org/10.1007/s00268-009-0252-7>.
- [35] Ferreira RS, de Barros LC, Abbade LPF, Barraviera SRCS, Silveiras MRC, de Pontes LG, et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: From bench to bedside - an overview. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 2017;23. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0109-8>.
- [36] Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira RS, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, et al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Research Bulletin* 2015;112:14–24. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.01.005>.
- [37] Buchaim RL, Andreo JC, Barraviera B, Ferreira Junior RS, Buchaim DV, Rosa Junior GM, et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury* 2015;46:655–60. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.01.031>.
- [38] Biscola NP, Cartarozzi LP, Ulian-Benitez S, Barbizan R, Castro MV, Spejo AB, et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 2017;23. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0103-1>.
- [39] Gromova A, La Spada AR. Harmony Lost: Cell–Cell Communication at the Neuromuscular Junction in Motor Neuron Disease. *Trends in Neurosciences* 2020;43:709–24. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.07.002>.
- [40] Court FA, Gillingwater TH, Melrose S, Sherman DL, Greenshields KN, Morton AJ, et al. Identity, developmental restriction and reactivity of extralaminar cells capping mammalian neuromuscular junctions. *Journal of Cell Science* 2008;121:3901–11. <https://doi.org/10.1242/jcs.031047>.
- [41] Jimshelishvili S, Sherman A I. *Physiology, Neuromuscular Transmission*. StatPearls Publishing; 2019.
- [42] Valdez G. Formation and maturation of neuromuscular junctions. *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*, Elsevier; 2020, p. 157–84. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814405-3.00008-4>.
- [43] Nishimune H, Shigemoto K. *Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in*

- Health and Disease. *Neurologic Clinics* 2018;36:231–40.
<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.01.009>.
- [44] Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual Review of Neuroscience* 1999;22:389–442.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.389>.
- [45] Bloch-Gallego E. Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2015;72:1029–43.
<https://doi.org/10.1007/s00018-014-1768-z>.
- [46] Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. *Cell* 1993;72:99–121. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80031-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80031-5).
- [47] Sanes JR. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:12601–4.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R200027200>.
- [48] Martinez-Pena Y Valenzuela I, Akaaboune M. The Metabolic Stability of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at the Neuromuscular Junction. *Cells* 2021;10.
<https://doi.org/10.3390/cells10020358>.
- [49] Lebbe EKM, Peigneur S, Wijesekara I, Tytgat J. Conotoxins Targeting nicotinic acetylcholine receptors: An overview. *Marine Drugs* 2014;12:2970–3004.
<https://doi.org/10.3390/md12052970>.
- [50] RUFF RL. Neurophysiology of the Neuromuscular Junction: Overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;998:1–10.
<https://doi.org/10.1196/annals.1254.002>.
- [51] Hong W. SNAREs and traffic. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1744:493–517.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.03.014>.
- [52] Holz RW, Zimmerberg J. Dynamic Relationship of the SNARE Complex with a Membrane. *Biophysical Journal* 2019;117:627–30.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.010>.
- [53] Ohkawara B, Ito M, Ohno K. Secreted signaling molecules at the neuromuscular junction in physiology and pathology. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22:1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22052455>.
- [54] Wu H, Xiong WC, Mei L. To build a synapse: Signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 2010;137:1017–33.
<https://doi.org/10.1242/dev.038711>.
- [55] Rodríguez Cruz PM, Cossins J, Beeson D, Vincent A. The Neuromuscular Junction in Health and Disease: Molecular Mechanisms Governing Synaptic Formation and Homeostasis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2020;13.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.610964>.
- [56] Depew AT, Mosca TJ. Conservation and innovation: Versatile roles for Irf4 in nervous system development. *Journal of Developmental Biology* 2021;9.
<https://doi.org/10.3390/jdb9010009>.
- [57] Chen PJ, Valenzuela IMPY, Aittaleb M, Akaaboune M. AChRs are essential for the targeting of rapsyn to the postsynaptic membrane of NMJs in living mice. *Journal of Neuroscience* 2016;36:5680–5. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4580-15.2016>.
- [58] Bruneau EG, Brenner DS, Kuwada JY, Akaaboune M. Acetylcholine Receptor Clustering Is Required for the Accumulation and Maintenance of Scaffolding Proteins. *Current Biology* 2008;18:109–15.

- <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.029>.
- [59] Bruneau E, Sutter D, Hume RI, Akaaboune M. Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *Journal of Neuroscience* 2005;25:9949–59. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3169-05.2005>.
 - [60] Ko CP, Robitaille R. Perisynaptic schwann cells at the neuromuscular synapse: Adaptable, multitasking glial cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2015;7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020503>.
 - [61] McMahan UJ, Horton SE, Werle MJ, Honig LS, Kröger S, Ruegg MA, et al. Agrin isoforms and their role in synaptogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 1992;4:869–74. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90113-Q](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90113-Q).
 - [62] McCarthy KJ. The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: Something Old, Something New. *Current Topics in Membranes* 2015;76:255–303. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.09.001>.
 - [63] Borges LS, Yechikhov S, Lee YI, Rudell JB, Friese MB, Burden SJ, et al. Identification of a motif in the acetylcholine receptor β subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization. *Journal of Neuroscience* 2008;28:11468–76. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2508-08.2008>.
 - [64] Mascarenhas JB, Rüegg MA, Winzen U, Halfter W, Engel J, Stetefeld J. Mapping of the laminin-binding site of the N-terminal agrin domain (NtA). *EMBO Journal* 2003;22:529–36. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg041>.
 - [65] Ohkawara B, Shen XM, Selcen D, Nazim M, Bril V, Tarnopolsky MA, et al. Congenital myasthenic syndrome-associated agrin variants affect clustering of acetylcholine receptors in a domain-specific manner. *JCI Insight* 2020;5. <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.132023>.
 - [66] Gomez AM, Burden SJ. The extracellular region of Lrp4 is sufficient to mediate neuromuscular synapse formation. *Developmental Dynamics* 2011;240:2626–33. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22772>.
 - [67] Wu H, Lu Y, Shen C, Patel N, Gan L, Xiong WC, et al. Distinct roles of muscle and motoneuron LRP4 in neuromuscular junction formation. *Neuron* 2012;75:94–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.033>.
 - [68] Weatherbee SD, Anderson K V., Niswander LA. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 2006;133:4993–5000. <https://doi.org/10.1242/dev.02696>.
 - [69] Barik A, Lu Y, Sathyamurthy A, Bowman A, Shen C, Li L, et al. LRP4 is critical for neuromuscular junction maintenance. *Journal of Neuroscience* 2014;34:13892–905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1733-14.2014>.
 - [70] Simon-Chazottes D, Tutois S, Kuehn M, Evans M, Bourgade F, Cook S, et al. Mutations in the gene encoding the low-density lipoprotein receptor LRP4 cause abnormal limb development in the mouse. *Genomics* 2006;87:673–7. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.01.007>.
 - [71] Ohazama A, Porntaveetus T, Ota MS, Herz J, Sharpe PT. Lrp4: A novel modulator of extracellular signaling in craniofacial organogenesis. *American Journal of Medical Genetics, Part A* 2010;152 A:2974–83. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33372>.
 - [72] Choi HY, Dieckmann M, Herz J, Niemeier A. Lrp4, a novel receptor for dickkopf 1

- and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover *In Vivo*. *PLoS ONE* 2009;4.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007930>.
- [73] Li Y, Pawlik B, Elcioglu N, Aglan M, Kayserili H, Yigit G, et al. LRP4 Mutations Alter Wnt/ β -Catenin Signaling and Cause Limb and Kidney Malformations in Cenani-Lenz Syndrome. *American Journal of Human Genetics* 2010;86:696–706.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.03.004>.
- [74] Mosca TJ, Luginbuhl DJ, Wang IE, Luo L. Presynaptic LRP4 promotes synapse number and function of excitatory CNS neurons. *ELife* 2017;6.
<https://doi.org/10.7554/eLife.27347>.
- [75] Gomez AM, Froemke RC, Burden SJ. Synaptic plasticity and cognitive function are disrupted in the absence of Lrp4. *ELife* 2014;3:1–16.
<https://doi.org/10.7554/eLife.04287>.
- [76] Tsivgoulis G, Dervenoulas G, Kokotis P, Zompola C, Tzartos JS, Tzartos SJ, et al. Double seronegative myasthenia gravis with low density lipoprotein-4 (LRP4) antibodies presenting with isolated ocular symptoms. *Journal of the Neurological Sciences* 2014;346:328–30. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.09.013>.
- [77] Tzartos JS, Zisimopoulou P, Rentzos M, Karandreas N, Zouvelou V, Evangelakou P, et al. LRP4 antibodies in serum and CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2014;1:80–7.
<https://doi.org/10.1002/acn3.26>.
- [78] Zhang H, Chen W, Tan Z, Zhang L, Dong Z, Cui W, et al. A Role of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 4 (LRP4) in Astrocytic Ab Clearance. *Journal of Neuroscience* 2020;40:5347–61. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0250-20.2020>.
- [79] Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, Rojas E, Mattsson K, Compton DL, et al. Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: Expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* 1995;15:573–84. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90146-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90146-9).
- [80] Herbst R. MuSk function during health and disease. *Neuroscience Letters* 2020;716:134676. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134676>.
- [81] Garcia-Osta A, Tsokas P, Pollonini G, Landau EM, Blitzler R, Alberini CM. MuSK expressed in the brain mediates cholinergic responses, synaptic plasticity, and memory formation. *Journal of Neuroscience* 2006;26:7919–32.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1674-06.2006>.
- [82] DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons M V., Poueymirou WT, Thomas S, et al. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 1996;85:501–12. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81251-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81251-9).
- [83] Inoue A, Setoguchi K, Matsubara Y, Okada K, Sato N, Iwakura Y, et al. Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Science Signaling* 2009;2:ra7–ra7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000113>.
- [84] Apel ED, Roberds SL, Campbell KP, Merlie JP. Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron* 1995;15:115–26. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90069-1).
- [85] Legay C, Mei L. Moving forward with the neuromuscular junction. *Journal of*

- Neurochemistry 2017;142:59–63. <https://doi.org/10.1111/jnc.14028>.
- [86] Piguet J, Schreiter C, Segura JM, Vogel H, Hovius R. Acetylcholine receptor organization in membrane domains in muscle cells: Evidence for rapsyn-independent and rapsyn-dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:363–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.139782>.
 - [87] Xing G, Xiong WC, Mei L. Rapsyn as a signaling and scaffolding molecule in neuromuscular junction formation and maintenance. *Neuroscience Letters* 2020;731. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135013>.
 - [88] Li L, Cao Y, Wu H, Ye X, Zhu Z, Xing G, et al. Enzymatic Activity of the Scaffold Protein Rapsyn for Synapse Formation. *Neuron* 2016;92:1007–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.023>.
 - [89] Ma CHE, Omura T, Cobos EJ, Latrémolière A, Ghasemlou N, Brenner GJ, et al. Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2011;121:4332–47. <https://doi.org/10.1172/JCI58675>.
 - [90] Sakuma M, Gorski G, Sheu SH, Lee S, Barrett LB, Singh B, et al. Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. *European Journal of Neuroscience* 2016;43:451–62. <https://doi.org/10.1111/ejn.13059>.
 - [91] Wu P, Chawla A, Spinner RJ, Yu C, Yaszemski MJ, Windebank AJ, et al. Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. *Neural Regeneration Research* 2014;9:1796–809. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.143424>.
 - [92] Furey MJ, Midha R, Xu QG, Belkas J, Gordon T. Prolonged target deprivation reduces the capacity of injured motoneurons to regenerate. *Neurosurgery* 2007;60:723–32. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000255412.63184.CC>.
 - [93] Kurimoto S, Jung J, Tapadia M, Lengfeld J, Agalliu D, Waterman M, et al. ACTIVATION OF THE WNT/ β -CATENIN SIGNALING CASCADE AFTER TRAUMATIC NERVE INJURY HHS Public Access. *Neuroscience* 2015;294:101–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.049>.
 - [94] Ozsoy U, Ogut E, Sekerci R, Hizay A, Rink S, Angelov DN. Effect of Pulsed and Continuous Ultrasound Therapy on the Degree of Collateral Axonal Branching at the Lesion Site, Polyinnervation of Motor End Plates, and Recovery of Motor Function after Facial Nerve Reconstruction. *Anatomical Record* 2019;302:1314–24. <https://doi.org/10.1002/ar.24122>.
 - [95] Tu H, Zhang D, Corrick RM, Muellemann RL, Wadman MC, Li YL. Morphological regeneration and functional recovery of neuromuscular junctions after tourniquet-induced injuries in mouse hindlimb. *Frontiers in Physiology* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00207>.
 - [96] Ma J, Shen J, Lee CA, Elsaidi GA, Smith TL, Walker FO, et al. Gene expression of nAChR, SNAP-25 and GAP-43 in skeletal muscles following botulinum toxin A injection: A study in rats. *Journal of Orthopaedic Research* 2005;23:302–9. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.08.027>.
 - [97] Su HL, Chiang CY, Lu ZH, Cheng FC, Chen CJ, Sheu ML, et al. Late administration of high-frequency electrical stimulation increases nerve regeneration without aggravating neuropathic pain in a nerve crush injury. *BMC Neuroscience* 2018;19. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0437-9>.

- [98] Cisterna BA, Cardozo C, Sáez JC. Neuronal involvement in muscular atrophy. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2014;8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00405>.
- [99] Ma J, Shen J, Garrett JP, Lee CA, Li Z, Elsaidi GA, et al. Gene expression of myogenic regulatory factors, nicotinic acetylcholine receptor subunits, and GAP-43 in skeletal muscle following denervation in a rat model. *Journal of Orthopaedic Research* 2007;25:1498–505. <https://doi.org/10.1002/jor.20414>.
- [100] R W, S J, LN N, PJ K. Investigation of the Expression of Myogenic Transcription Factors, microRNAs and Muscle-Specific E3 Ubiquitin Ligases in the Medial Gastrocnemius and Soleus Muscles following Peripheral Nerve Injury. *PloS One* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0142699>.
- [101] Kang H, Tian L, Mikesch M, Lichtman JW, Thompson WJ. Terminal schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *Journal of Neuroscience* 2014;34:6323–33. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4673-13.2014>.
- [102] Bloch-Gallego E. Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2015;72:1029–43. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1768-z>.
- [103] Pinto CG, Leite APS, Sartori AA, Tibúrcio FC, Barraviera B, Junior RSF, et al. Heterologous fibrin biopolymer associated to a single suture stitch enables the return of neuromuscular junction to its mature pattern after peripheral nerve injury. *Injury* 2020;52:731–7. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.10.070>.
- [104] Leite APS, Pinto CG, Tibúrcio FC, Sartori AA, de Castro Rodrigues A, Barraviera B, et al. Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points. *Injury* 2019;50:834–47. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.03.027>.
- [105] Kempe PRG, Chiarotto GB, Barraviera B, Ferreira RS, de Oliveira ALR. Neuroprotection and immunomodulation by dimethyl fumarate and a heterologous fibrin biopolymer after ventral root avulsion and reimplantation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 2020;26. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0093>.
- [106] Buchaim DV, Cassaro CV, Shindo JVTC, Coletta BB della, Pomini KT, de Oliveira Rosso MP, et al. Unique heterologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties: A systematic review. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 2019;25. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0038>.
- [107] Assaf K, Leal CV, Derami MS, de Rezende Duek EA, Ceragioli HJ, de Oliveira ALR. Sciatic nerve repair using poly(ε-caprolactone) tubular prosthesis associated with nanoparticles of carbon and graphene. *Brain and Behavior* 2017;7. <https://doi.org/10.1002/brb3.755>.
- [108] Evans GRD, Brandt K, Widmer MS, Lu L, Meszlenyi RK, Gupta PK, et al. In vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 1999;20:1109–15. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00010-1).
- [109] Parvizi D, Friedl H, Schintler M v., Rappl T, Laback C, Wiedner M, et al. Use of 2-octyl cyanoacrylate together with a self-adhering mesh (Dermabond™ Prineo™) for skin closure following abdominoplasty: An open, prospective, controlled,

- randomized, clinical study. *Aesthetic Plastic Surgery* 2013;37:529–37. <https://doi.org/10.1007/s00266-013-0123-3>.
- [110] Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga FC, Oliveira ALR, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy* 2014;5. <https://doi.org/10.1186/scrt467>.
- [111] Neptune RR, Kautz SA, Zajac FE. Contributions of the individual ankle plantar flexors to support, forward progression and swing initiation during walking. *Journal of Biomechanics* 2001;34:1387–98. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(01\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(01)00105-1).
- [112] Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1989;83:129–36. <https://doi.org/10.1097/00006534-198901000-00024>.
- [113] Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 2017;18. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>.
- [114] Jones RA, Reich CD, Dissanayake KN, Kristmundsdottir F, Findlater GS, Ribchester RR, et al. Correction to NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure - Function relationships at the neuromuscular junction (*Open Biology* (2016) 6 (160240) DOI: 10.1098/rsob.160335). *Open Biology* 2017;7. <https://doi.org/10.1098/rsob.160240>.
- [115] ZAR JH. *Biostatistical analysis*, 4th impression. Dorling Kindersley (India) Pvt Ltd, Delhi, 2009;110:92.
- [116] Johnson R, Wichern D. *Applied multivariate statistical analysis* 2002.

Capítulo 1

Artigo a ser submetido a revista: **Injury** (Editor in Chief: P. V. Giannoudis)

Fator de impacto: 2.586

ACETYLCHOLINE RECEPTORS OF THE NEUROMUSCULAR JUNCTIONS PRESENT NORMAL DISTRIBUTION AFTER PERIPHERAL NERVE INJURY AND REPAIR THROUGH NERVE GUIDANCE ASSOCIATED WITH FIBRIN BIOPOLYMER.

Ana Paula Silveira Leite¹ Email: ana.p.leite@unesp.br, Carina Guidi Pinto¹, Felipe Cantore Tibúrcio¹, Kevin Silva Muller², Carlos Roberto Padovani², Benedito Barraviera³, Rui Seabra Júnior³, Claudenete Vieira Leal⁴, Abrar Alhind^{5,6}, Ross A. Jones^{5,6}, Thomas H. Gillingwater^{5,6}, Cintia Yuri Matsumura², Selma Maria Michelin Matheus^{1,2}.

¹ São Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu.

² São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Botucatu.

³ Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP)-Unesp, Botucatu.

⁴ School of Mechanical Engineering-University of Campinas-(Unicamp), Campinas.

⁵ Edinburgh Medical School: Biomedical Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh.

⁶ Euan MacDonald Centre for Motor Neurone Disease Research, University of Edinburgh, Edinburgh.

Abstract

Peripheral nerve injuries (PNI) lead to failure of the electrical signal transmission with alterations in the Agrin-LRP4-MuSK pathway, primarily responsible for maintaining acetylcholine receptor clusters (AChRs). This results in disaggregation of AChRs and change from epsilon (mature, innervated) to gamma (immature, denervated) subunit. The tubulization technique has been shown to be effective for PNI repair and it also allows the use of adjuvants, such as fibrin biopolymer (FB). The aim of this study was to evaluate the effect of the association of tubulization with FB after PNI on AChRs and associated proteins. Fifty two adult male Wistar rats were used, distributed in 4 experimental groups: Sham Control (S), Denervated Control (D); Tubulization (PCL) and Tubulization + Fibrin Biopolymer (FB). In Group S, only incision, localization, and debridement of the ischiatic nerve was performed. In Groups D, PCL, and FB complete nerve injury (gap of 8 mm) was performed. After neurotmesis in Group D, the stumps were inverted and fixed to the subcutaneous mesh. In the PCL and FB groups the nerve stumps were inserted and fixed to the polycaprolactone (PCL) tubular prosthesis (12 mm) with 10-0 suture. In the FB group 500 µl of FB was added after fixing the stumps to the tube. Throughout the experimental period, every 15 days, Catwalk was performed in all animals. Ninety days after surgery the animals were weighed; the soleus muscles and the right ischiatic nerves were collected, fixed, and submitted to the following analyses: (a) morphological and morphometric analysis of AChRs by laser scanning confocal microscopy; (b) morphological and morphometric analysis of the ischiatic nerve; (c) protein quantification of AChRs: alpha, gamma, and epsilon, of Schwann cells, agrin, LRP4, MuSK, rapsin, MMP3, MyoD, myogenin, MURF1 and atrogin-1. In the analysis of the ischiatic nerve there was no difference among groups but in the PCL, there was a decrease in the area of the axons in relation to S. The functional analysis of the fibular nerve showed no difference among groups, but for the other variables analyzed, the experimental groups did not reach the values of group S. In relation to the NMJs, the FB group showed morphological and morphometric approximation (compactness index; area of the AChRs and motor plate) to group S, while the PCL group did not reach the same values and morphology. Also in the FB group, there was increased protein expression of S100 and reduced MyoD when compared to S; and regarding AChRs, there was an increase compared to all the other groups. The results found in this study reinforce the validity of using PCL-based tubulization to repair severe injuries and the beneficial effect of FB, along with tubulization technique. The positive association of these methods resulted in the AChRs stabilization and it potentiates the neuromuscular regeneration. Which was demonstrated by the morphology and morphometry of AChRs, by the increase in Schwann cells (S100) and by the mature innervated subunit of AChRs (epsilon).

1-Introduction

Peripheral nerve injuries are commonly caused by trauma and can severely impact the lives of affected patients, causing sensory and motor deficits and even chronic pain [1]. After this type of injury, denervation of the neuromuscular junctions (NMJs) occurs. NMJs are a specific synapse of the peripheral nervous system, composed mainly of the connection between the lower motor axon and the muscle fiber it innervates, in addition to the perisynaptic Schwann cells [2].

The alteration of the electrical impulse, resulting from denervation, is initially detected by the perisynaptic Schwann cells, followed by signaling for increased synthesis of acetylcholine receptor subunits (AChRs), accompanied by the increase of myogenic regulatory factors (MRFs), MyoD and Myogenin [3].

Denervation leads to destabilization of acetylcholine receptor clusters (AChRs) and changes from epsilon (mature, innervated) to gamma (immature, denervated) subunits. With the failure of electrical signal transmission, and therefore, muscle contraction, there are changes in the Agrin-LRP4-MuSK pathway, primarily responsible for the maintenance of AChRs clusters, resulting in increased fragmentation of the motor plate area [4], [5].

Long-term denervation can also lead to a reduction in the number of satellite cells, and consequent protein degradation, with elevated expression of genes linked to the ubiquitin-proteasome pathway, such as atrogin-1 and MURF1 [6].

In cases of severe injury, where there is complete disruption of the nerve structure, surgical intervention is necessary for functional reestablishment [7]. Several alternatives have been investigated in order to potentiate or even complement the surgical techniques, aiming at better morphological and functional results [8].

Among the most recent surgical techniques, artificial and biological conduits or tubes stand out. These provide an environment for the stumps to reunite, with ideal properties: structural characteristics that allow alignment of regenerating axons, mechanical properties to provide structural support, permeability to provide trophic support, and flexibility and biodegradability [9]. Among the available

materials, polycaprolactone (PCL) is approved for the repair of human nerve injuries [10], being transparent and flexible, facilitating the surgical procedure [11].

Fibrin glues have also been widely used in the repair of peripheral nerve lesions, either replacing or complementing the neurorrhaphy technique, acting as a trophic and protective factor in the lesion environment [12]. Among the available glues, the fibrin biopolymer stands out, a product that differentiates itself by not using human blood in its composition, besides having good hemostatic and adhesive capacity [13]. This biopolymer has shown positive results when used as a main or adjunct therapy in the repair of peripheral nerve injuries [14–17].

Taking these factors into consideration and also the importance of better understanding the response of the NMJs to this type of injury, the objective of this study was to evaluate the association of fibrin biopolymer with tubulization using polycaprolactone in nerve reconstruction after peripheral nerve injury: focusing on the NMJs and associated proteins.

2-Materials and Methods

Fifty two adult (90 days old) male Wistar rats from the Central Animal House of UNESP were used, with an average weight ranging from 300 to 400 g (CEUA FMB 1244/2017). The animals were randomly distributed in 4 experimental groups: S (Control-Sham); D (Control-Desnerved); PCL (tubulization); FB (tubulization + fibrin biopolymer).

2.1-Preparation of the prostheses for tubulization

The membranes were prepared from 5 % (w/v) PCL by the solvent evaporation method. PCL was dissolved in chloroform (Merck, Germany) and kept under stirring for 12 hours, for complete dissolution of the polymer. After 12 hours, the PCL solution was placed in glass molds, inside a glass vat, in a saturated atmosphere by the solvent for its evaporation and for obtaining the membranes [18]. The finished membranes were then molded using 1.6 mm holders and the walls sealed using surgical adhesive (DERMABOND* HIGH VISCOSITY) and then, cut

to a length of 12mm.

2.2-Surgical procedure

The animals were initially anesthetized through I.P. injection (intraperitoneal) of Ketamine (Dopalen - 90mg/kg) and Xylazine (Rompun - 10mg/kg) and the right ischiatic nerves were exposed. Nerve injury was performed by complete nerve transection, leaving a 8 mm gap between the stumps, in a standardized fashion, about 3 mm anterior to the trifurcation of the ischiatic nerve, on the right antimer in the animals of D, PCL and FB groups. In the animals of group D, after the injury, the stumps were inverted and sutured to the subcutaneous mesh. In the PCL and FB groups, after the lesion, the proximal and distal stumps were fixed to the polycaprolactone tube, always at the top of the tube with a single stitch of 10-0 thread. In the FB group, after fixing the stumps to the conduit, 500 µl of fibrin biopolymer was added to the tube (17). In the animals of group S, the ischiatic nerve was only located and debrided, and then the muscles and skin were sutured. After the experimental period (90 days), all animals were weighed and anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (Dopalen - 90mg/kg) and Xylazine (Rompun - 10mg/kg) and then euthanized with sodium thiopental (120 mg/kg); the right soleus muscles and the right ischiatic nerves were collected, fixed, and properly stored. The soleus muscles were also weighed, and then the relative weight was calculated.

2.3 Gait evaluation using “Catwalk” software (n=13).

This evaluation was performed before surgery and on days 15, 30, 45, 60, 75 and 90, after the lesion, in all animals according to the experimental groups, always recording 3 runs for each animal. The study was based on the footprints and gait of the animal, under a glass platform with an attached camera. The runs were evaluated by software (Catwalk XT 9.1-Noldus), considering the duration, orientation, and coordination of movements among the legs. Max contact area, print

area, stand rate, and average run duration were evaluated. The values were expressed as the ratio of the ipsilateral paw to the contralateral paw, aiming at a careful evaluation, considering the possibility of compensation of the animal's non-injured paw. With the data obtained in the catwalk, an analysis of the functional index of the fibular was performed through the following formula: $IFF = 174.9 \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right) + 80.3 \times \left(\frac{EPL-NPL}{NPL} \right) - 13.4$. Where E refers to the injured side and N to the non-injured side, TS refers to the distance between the first and fifth toes (toe spread) and PL refers to the distance between the third toe and the heel (print length) (18).

2.4-Confocal microscopy for AChRs (n=5)

After intracardiac perfusion the right soleus muscles were reduced to their middle third and sectioned longitudinally for labelling immunohistochemistry of AChRs using α -bungarotoxin conjugated to rhodamine (Rh-BTX - Molecular Probes T1175,1: 1000 in PBS). The slides obtained were photographed on a confocal laser scanning microscope (Leica-TCS-SP5) at the Electron Microscopy Center of the Institute of Biosciences of UNESP- Botucatu.

2.4.1-Analysis of AChRs using the "NMJ morph" plugin

The analyses were performed using Image J software [19], following the specific sequence added to the tools of the "NMJ morph" plugin [20], developed in order to enable a robust and reliable analysis of the NMJs. About 50 images from each animal were analysed, totalizing the approximate value of 1000 images. The parameters evaluated were AChRs area and perimeter; endplate diameter, area, and perimeter; compactness; number and average area of AChR clusters, and their fragmentation.

2.5-Morphological and morphometric analysis of the ischiatic nerve (n=5)

The ischiatic nerves were exposed and they had a removed fragment of about 3 mm (referring to the area of the lesion) fixed with 1% osmium tetroxide and stained with toluidine blue, the slides were then photographed and analysed, using free software Image J [19]. Five random fields were used for morphometric analysis of the ischiatic nerve, totalizing 5% of the sample, and from there, the number of axons was calculated, as described by Sobral and researchers [21]. The following parameters were analyzed: axon number, axon and nerve fiber area, diameter and perimeter, nerve fragment area and perimeter, myelin sheath thickness, and the calculation of the G-ratio.

2.6- Protein expression analysis by Western Blotting

Samples of soleus muscles after freezing were homogenized in RIPA and protease inhibitors (30mg of tissue/100µl of extraction buffer). Tissue extracts were obtained by centrifugation for 20 min at 14000 rpm at 4°C. The protein content was determined by the Bradford method (Bio-Rad protein assay) and the equivalent 30 micrograms of protein was applied to the polyacrylamide gel. After electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were subsequently incubated with the primary antibodies : of the AChRs alpha (1:200- santa cruz- sc-136130), gamma (1:1000-santa cruz- sc-13998) and epsilon (1: 2000-santa cruz- sc-376747); of the proteins associated with cluster formation of AChRs: agrin (1:1000- abcam- ab12362), LRP4 (1:1000- abcam- ab174637), MuSK (1:1000- Bioss- bs6473R), Rapsin (1: 1000- santa cruz- sc-58585); the metalloproteinase 3 (MMP3) that controls agrin levels (1:1000- abcam- ab52915); the Schwann cell marker- S100 (1:1000- abcam- ab4066); the MRFs : MyoD (1:1000- santa cruz- sc-377460) and Myogenin (1:1000- sigma- M5815) and the atrogenes: atrogen-1 (1:1000- santa cruz- sc-166806) and MURF1 (1:1000- santa cruz- sc-398608). After washing, the membranes were incubated for 1 hour in HRP secondary antibody and revealed using chemiluminescent substrate for Western blotting (AMERSHAM ECLTM

PRIME, GE Healthcare). Semiquantitative band densitometry analysis was performed using Image J [19]. The data were normalized using the GAPDH values (1:5000- Cell Signaling - 14C10).

2.7-Statistical analysis

The results were expressed as mean and standard deviation, and statistically significant differences were considered when $p < 0.05$. For the analyses of: animal weight, muscle weight and relative weight; area, perimeter and mean diameter of nerve fibers and axons; nerve area and perimeter; myelin sheath thickness and G-ratio; quantification of proteins (S100, AChR α 1 and AChR γ , AChR ϵ , MuSK, Rapsin and MURF1); area and perimeter of AChRs; diameter, area and perimeter of the motor plate; compaction index; number and mean area of AChRs clusters and their fragmentation, technique for analysis of variance was used for the model with one factor complemented with Tukey's multiple comparison test [22]. For the analyses referring to the Catwalk both when the times were fixed and when the comparison was among the groups, a multivariate analysis of variance technique was used for the model of repeated measures in independent groups complemented with Bonferroni's multiple comparison test [23]. For the number of axons and nerve fibers and the protein quantification of Agrin, LRP4, MyoD, Myogenin, Atrogin-1 and MMP3 proteins the technique used was non-parametric analysis with Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison [22].

3-Results

3.1 Animal weight, soleus muscle weight and relative weight.

There was no difference among the groups when comparing the weight of the animals at the end of the experiment (Figure 1-A).

Regarding the soleus muscle weight, the groups D, PCL, and FB showed lower values (77%, 60% and 65% respectively) when compared to the group S. The

same pattern was found for the relative weight (77%, 61% and 66%) (Figure 1 B and C).

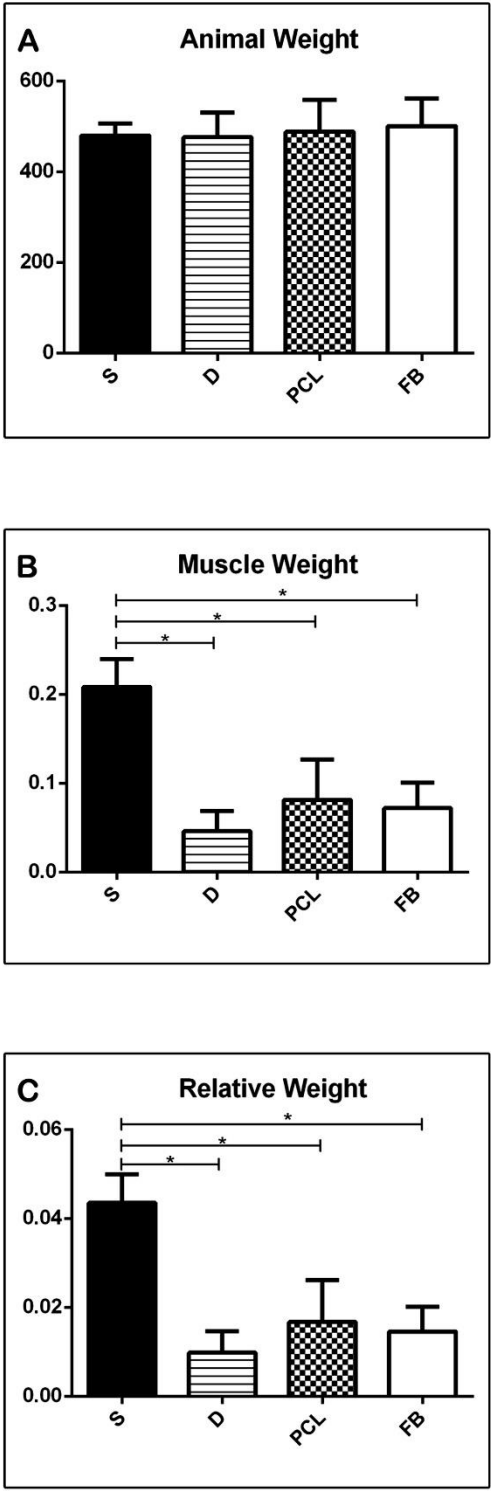


Figure 1: Graph of means and standard deviation: of weight (g) of animals (A); of soleus muscle

weight (g) (B); of relative weight (C) for all experimental groups. For all parameters, the analysis of variance technique was used for the one-factor model complemented with Tukey's multiple comparison test (Zar, 2009), * $p < 0.05$).

3.2- Gait evaluation using the "Catwalk" software.

Through the analysis of the comparisons made among the groups, regarding the print area of the animals, starting on the period 60 days after surgery, there was a statistical difference between the groups, where all experimental groups showed values of print area lower than those of group S ((60 days-D<S=31%, PCL<S=37% and FB<S=40%), (75 days-D<S=38%, PCL<S=41% and FB<S=19%) and (90 days-D<S=41%, PCL<S=27% and FB<S=43%) (Figure 2-E). The max contact area was different at 15 days after injury, and these results maintained a pattern, whose values of the experimental groups were lower when compared to group S (D<S=44%, PCL<S=30% and FB<S=29%). On day 30 after surgery, group D showed similar values to group S, while the other groups showed lower values compared to group S (PCL<S=40% and FB<S=43%) (Figure 2-F). On days 45 (D<S=22%, PCL<S=44% and FB<S=32%), 60 (D<S=28%, PCL<S=35% and FB<S=33%), 75 (D<S=34%, PCL<S=32% and FB<S=16%) and 90 (D<S=44%, PCL<S=21% and FB<S=39%) the same pattern as day 15 post surgery was observed with lower values in the experimental groups compared to group S. The data regarding the average run duration and the fibular functional index showed no differences between the groups (Figure 2-G and H).

All experimental groups showed lower values of stand rate at 15 days after injury compared to S (D<S=30%, PCL<S=28% and FB<S=23%). This response pattern was maintained at 30 (D<S=19%, PCL<S=31% and FB<S=36%), 45 (D<S=32%, PCL<S=35% and FB<S=28%), 60 (D<S=37%, PCL<S=37% and FB<S=31%) and 75 days (D<S=42%, PCL<S=36% and FB<S=34%) after injury. At 90 days after surgery, the values of group D were similar to those of group S, and the PCL and FB groups continued to show lower values when compared to group S (PCL<S=24% and FB<S=39%) (Figure 2-I).

When the comparisons were made by fixing the group and analysing the course of the experimental period, in relation to print area there was no difference in the values of group S (Figure 3-A). In group D, from day 60 after injury, there was a reduction in the values of this parameter when compared to the pre-injury period (Figure 3-B). The PCL group showed lower values at 30 and 75 days compared to the pre-injury period (Figure 3-C). The FB group also showed lower values on days 30 and 60, when compared to the pre-injury period (Figure 3-D).

The analysis of the max contact area revealed that there was no difference in groups S and PCL within all experimental time analysed (Figure 3-E and G). In group D, at 15, 75 and 90 days, the values of this parameter were lower than before the injury (Figure 3-F). In the FB group, the values presented at 15, 30, 45, 60 and 75 days were lower when compared to the pre-injury values (Figure 3-H).

The values for the average run duration in group S at 30, 45, 60, 75 and 90 days were lower when compared to the preoperative period and 15 days after surgery (Figure 3-I). In group D the values of this parameter at 75 and 90 days were lower than in the preoperative period and 15 days after surgery (Figure 3-J). In the PCL group all the values presented during the experimental period were lower than pre-injury, and the values at 60, 75 and 90 days were lower than 15 days after injury and reconstruction (Figure 4 K). The FB group presented all values (15, 30, 45, 60, 75 and 90 days) lower than the pre-injury and also the values at 45, 60, 75 and 90 days were lower than the values at 15 days after injury and repair (Figure 4-L).

Regarding the fibular functional index values, there was no difference among the groups (Figure 4 M, N, O and P).

As for the values of the stand rate, there was no difference in any experimental period within the S group (Figure 4-Q). In the denervated group, the values presented in periods 15, 45, 60 and 75 were lower when compared to the pre-injury values (Figure 4-R). In the PCL and FB groups, all the values presented during the experimental period were lower than the values obtained in the pre-injury period (Figure 4-S and T).

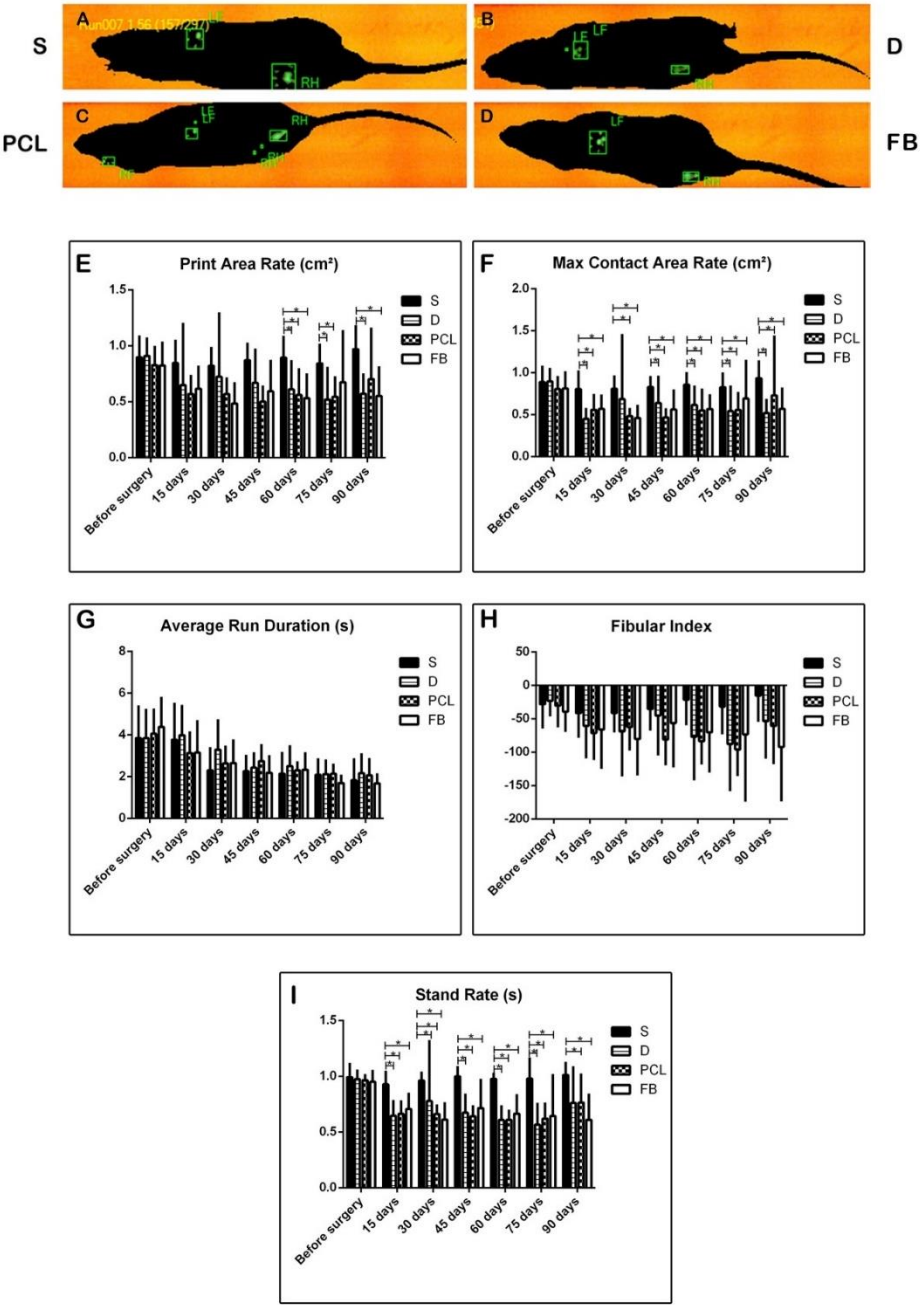


Figure 2: Graphs and illustrations of the means and standard deviation of the functional analyses (Catwalk) for the experimental groups at different times. A-D: illustration of the analyses in the Catwalk software runs according to experimental group. A: Sham control group (S); B: denervated group (D); C: Tubulization group (PCL); D: Tubulization + Fibrin biopolymer (FB) group; E: print area ratio graph (cm); F: max contact area ratio graph; G: Average run duration ratio graph; H: Fibular functional index graph; I: Stand rate graph. For all variables we used the multivariate analysis of variance technique, for the model of repeated measures in independent groups complemented with the Bonferroni multiple comparison test * $p < 0.05$.

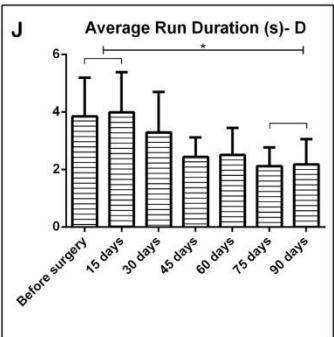
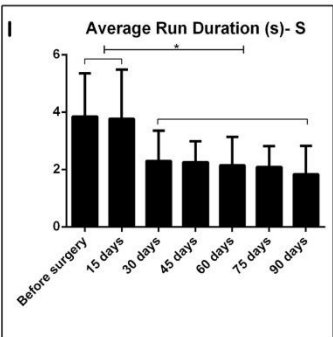
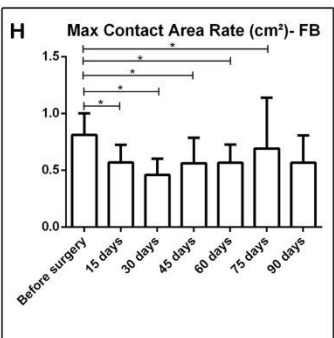
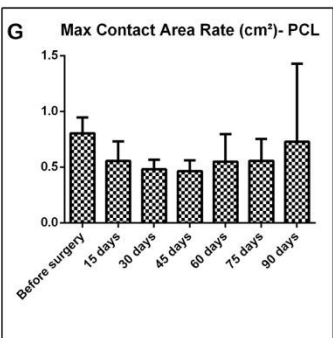
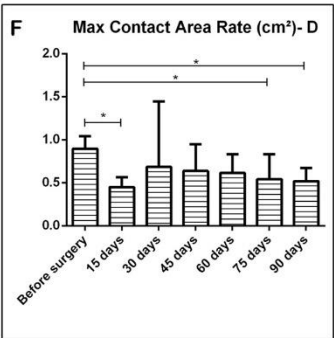
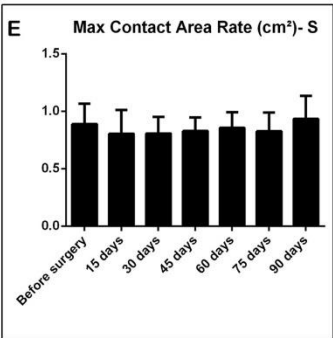
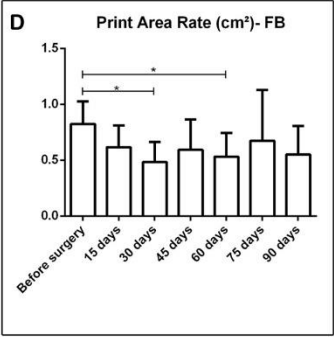
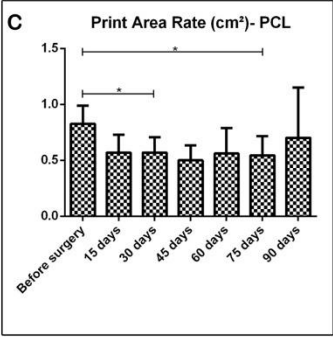
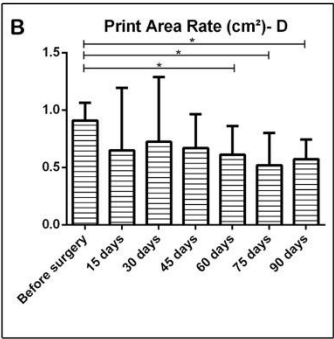
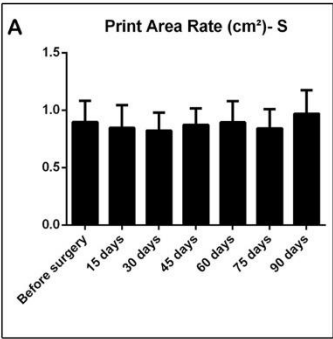


Figure 3: Graphs and illustrations of the means and standard deviation of the functional analyses (Catwalk) for the experimental groups with the comparisons made by fixing the group and comparing the experimental times. A-D: Graph of the print area ratio (cm) respectively of groups S, D, PCL and FB; E-H: Graphs of the max contact area ratio respectively of groups S, D, PCL and FB; I and J: Graphs of the average run duration ratio respectively of groups S, D. For all variables, technique for multivariate analysis of variance was used, for the model of repeated measures in independent groups complemented with Bonferroni's multiple comparison test $*p < 0.05$.

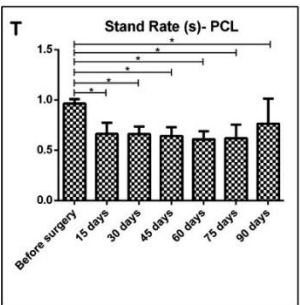
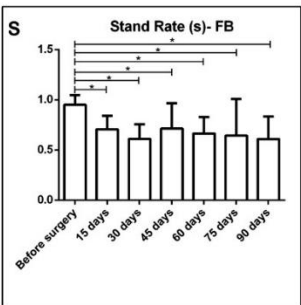
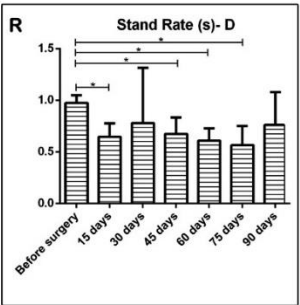
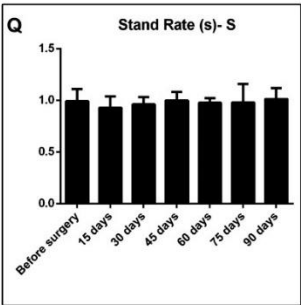
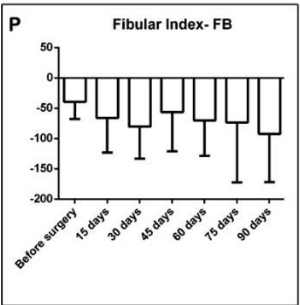
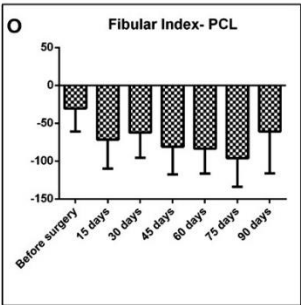
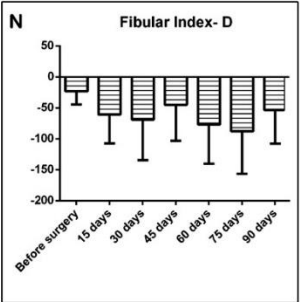
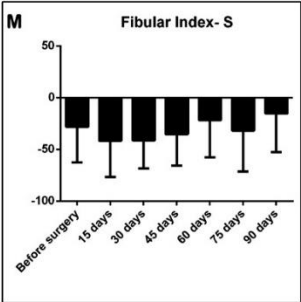
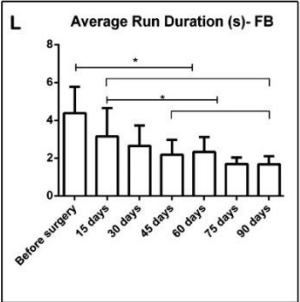
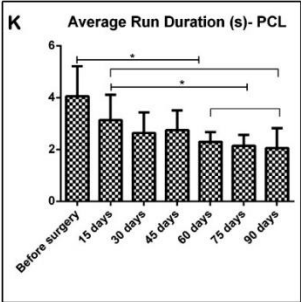


Figure 4: Graphs and illustrations of the means and standard deviation of the functional analyses (Catwalk) for the experimental groups with the comparisons made by fixing the group and comparing the experimental times. K-L: Graphs of the ratio of average run duration, respectively of groups PCL and FB; M-P: Graphs of the fibular functional index, respectively of groups S, D, PCL and FB; Q-T: Graphs of the ratio of the stand rate, respectively of groups S, D, PCL and FB. For all variables analysed multivariate analysis of variance technique was used for the model of repeated measures in independent groups complemented with Bonferroni's multiple comparison test * $p < 0.05$.

3.3- Analysis of AChRs using the "NMJ morph" plugin

From the images obtained after histochemical labeling of AChRs, it was possible to observe that there were homogeneous responses of the fluorophores with the AChRs in auto fluorescence in all groups. In group S there was characterization of the presence of continuous arms running in various orientations along the muscle fiber. Similar morphology was observed in the FB group (Figure 5-A and D).

In group D the morphology of the AChRs indicated a sparser distribution, with a morphological approximation to the PCL group (Figure 5-B and C).

The morphometric analysis corroborated these aspects where the values regarding the compactness and the AChRs and endplate area of the groups D and PCL presented lower values when compared to the values of group S (Compactness: D and PCL < S = 13%; AChRs area: D and PCL < S = 43% and endplate area D and PCL < S = 45%) (Figure 5-E, G and H); and in the FB group these values were statistically similar to group S.

All experimental groups showed lower values of the mean area of AChRs clusters when compared to the values of group S (D < S = 58%, PCL < S = 53% and FB < S = 37%) (Figure 5-L).

The number of AChRs clusters, perimeter of AChRs and endplate, endplate diameter and fragmentation index (Figure 5-F, I, J, K and M) showed no difference among the groups.

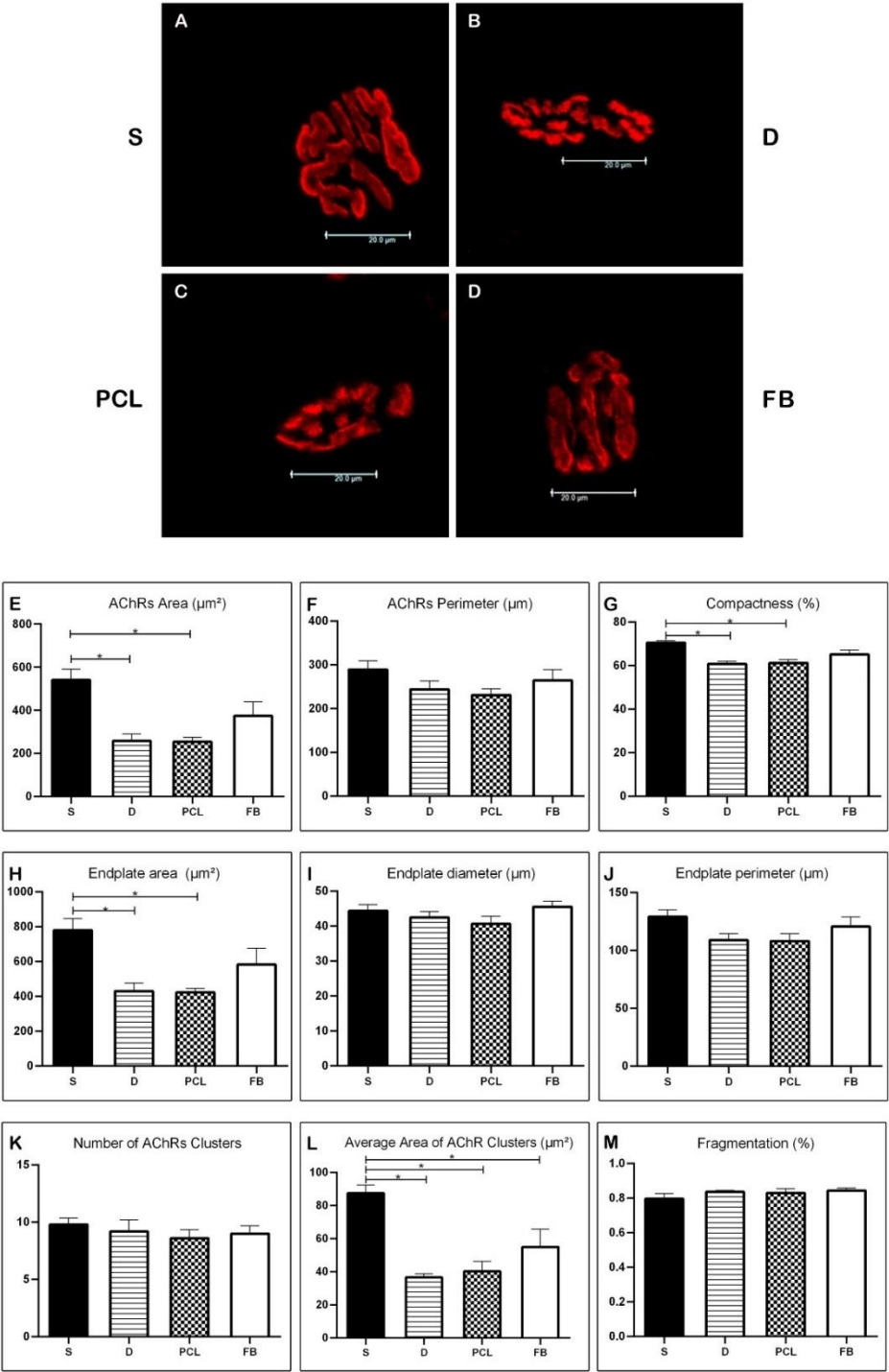


Figure 5 - Confocal microscopy of AChRs and graphs of the analysis using "NMJ-morph". A-D: Confocal microscopy of acetylcholine receptors according to experimental group. A: Sham control group (S); B: Denervated group (D); C: Tubulization group (PCL); D: Tubulization + Fibrin

biopolymer (FB) group; E: AChRs area graph; F: AChRs perimeter graph; G: Compactness graph; H: endplate area graph. I: Graph of the endplate diameter; J: Graph of the endplate perimeter; K: graph of the number of AChRs clusters; L: graph of the average area of the AChRs clusters; M: graph of the fragmentation index. For all parameters the statistical analysis used was the technique of analysis of variance for the one-factor model complemented with Tukey's multiple comparisons test (Zar, 2009), * $p < 0.05$).

3.4-Morphological and morphometric analysis* of the ischiatic nerve

In the PCL and FB groups from the analysis of the fragment of the ischiatic nerve, an increase of the extracellular matrix is highlighted (Figure 6-B and C), as well as the heterogeneity of the area of the regenerated nerve fibers. It was possible to notice several intact nerve fibers in the FB and PCL groups, although the fibers appeared smaller and more irregular when compared to group S, where the axons were intact with the myelin sheath preserved, in a pattern compatible with the morphology of a healthy nerve (Figure 6-A).

The morphometric analysis showed that the values in the PCL group were lower than those presented by group S, regarding the area of the axons ($PCL < S = 50\%$ - Figure 7-E).

As for the parameters of the axon perimeter, nerve fiber and nerve fragment perimeter; the area and perimeter of nerve fibers and nerve fragment; the average diameter of axons and nerve fibers, the number of axons; myelin sheath thickness and G ratio, there was no difference among the experimental groups (Figure 7-D,F,G,H,I,J,K,L,M and N).

**This analysis was not performed in group D, due to the absence of intact nerve fibers in the ischiatic nerve.*

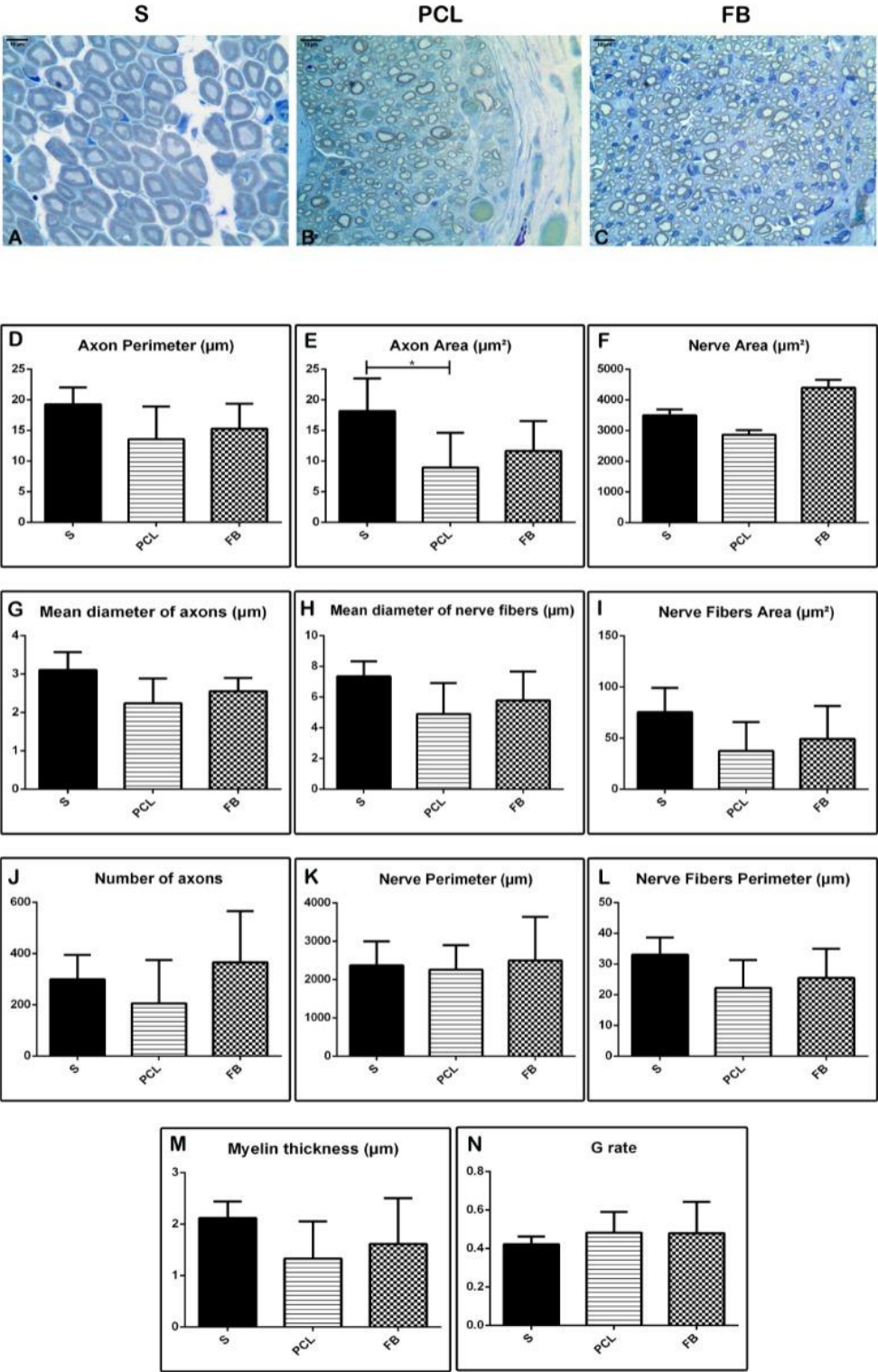


Figure 6: A-C: Photomicrographs of ischiatic nerve cross sections stained in osmium tetroxide and

toluidine blue. A: Sham control group (S); B: Tubulization group (PCL); C: Tubulization + Fibrin biopolymer (FB) group; D-N: Graphs of the means and standard deviation of ischiatic nerve morphometric analysis. D: Perimeter of axons (μm); E: Area of axons (μm^2); F: area of nerve fragment (μm^2); G: average diameter of axon (μm); H: average diameter of nerve fibers (μm); I: area of nerve fibers (μm^2); J: number of axons. K: nerve fragment perimeter (μm); L: nerve fiber perimeter (μm); M: myelin sheath thickness (μm); N: G ratio. For the parameters presented in: D-I and K-N the statistical analysis used was the technique of analysis of variance for the one-factor model supplemented with Tukey's multiple comparison test (Zar, 2009), $*p < 0.05$). For the number of axons, the technique for non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) for the one-factor model complemented with Dunn's multiple comparison test (Zar, 2009), $*p < 0.05$ was used.

3.5- Protein expression analysis by Western Blotting

The protein expression analysis showed that there was no difference in the values presented among the experimental groups regarding the $\alpha 1$ and γ subunits of AChRs (Figure 7-D and E). However, the ε subunit (Figure 7-F), was higher in the FB group in relation to all the other groups (FB>S=800%, FB>D=317%, FB>D=307%).

Regarding the expression of the proteins Agrin, MuSK, Rapsin, LRP4, Myogenin, Atrogin-1, MURF1 and MMP3 there was no statistical difference among the groups (Figure 7-B and C and Figure 8-A, B, D-G).

A progressive, although not statistical, increase in S100 protein among the experimental groups is striking $S < D < PCL < FB$. The protein expression values of this protein were statically higher in the FB group when compared to S group (FB>S = 600%) (Figure 7-A). The FB group also showed reduced MyoD protein expression when compared to S group (FB<S = 89%) (Figure 8-C).

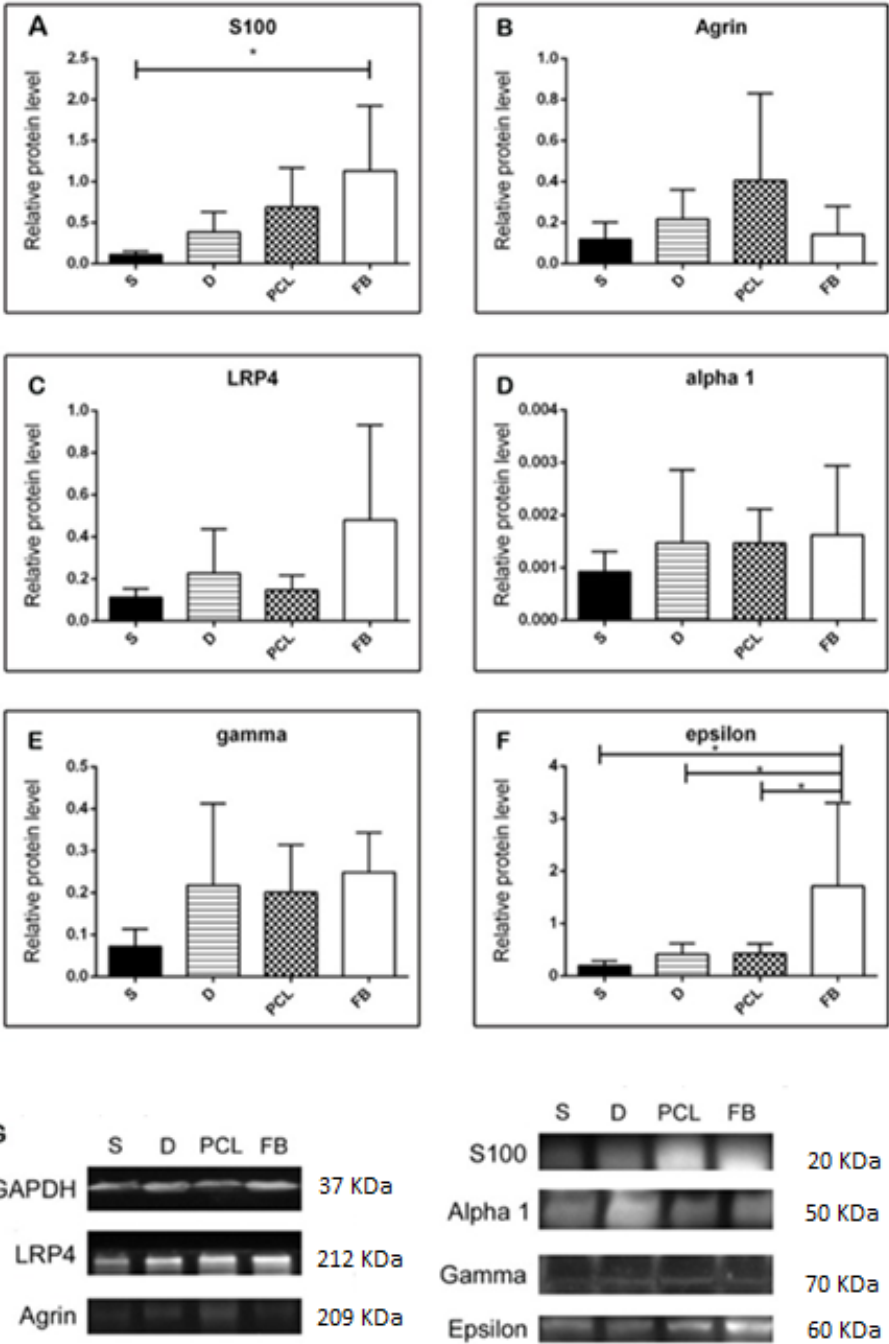


Figure 7. Graphs of relative protein expression levels: S100(A), Agrin(B), LRP4 (C), AChR α 1 (D) AChR γ (E), AChR ϵ (F) and representative immunoblotting of each of the proteins (G). For the parameters shown in A, D, E and F the statistical analysis used was the analysis of variance technique for the one-factor model supplemented with Tukey's multiple comparison test (Zar, 2009), * $p < 0.05$). For Band C the technique for non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) was used for the one-factor model complemented with Dunn's multiple comparison test (Zar, 2009),* $p < 0.05$).

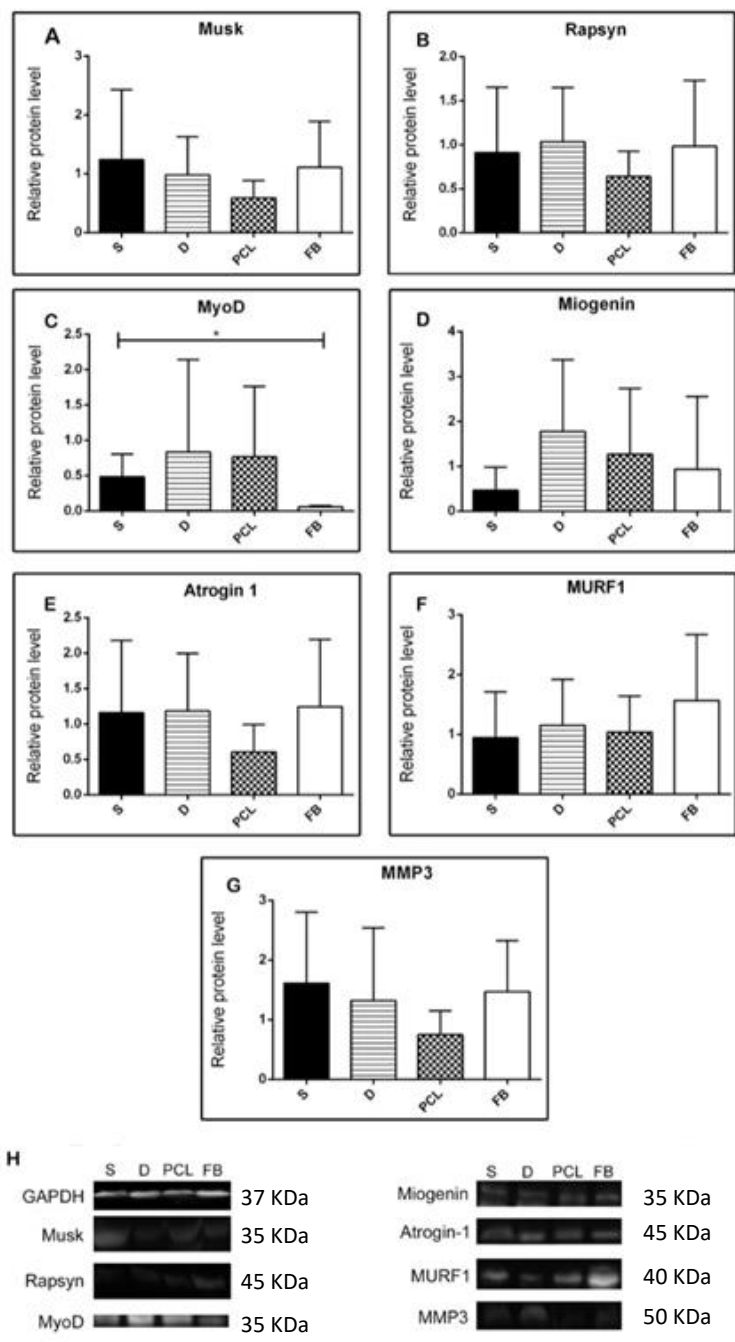


Figure 8. Graphs of relative protein expression levels: MuSK(A), Rapsin(B), MyoD (C), Myogenin (D), Atrogin-1 (E), MURF1 (F), MMP3 (G) and representative immunoblotting of each of the proteins (H). For the parameters shown in A and B the statistical analysis used was the technique of analysis of variance for the one-factor model supplemented with Tukey's multiple comparison test (Zar, 2009), * $p < 0.05$). For C-G the technique for non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) was used for the one-factor model complemented with Dunn's multiple comparison test (Zar, 2009),* $p < 0.05$).

4- Discussion

Although widely studied, the repair of peripheral nerve injuries remains a challenge for public health, because even after surgical interventions, functional recovery is not satisfactory [8]. For the most severe lesions, where suturing is not a possible technique, autograft is considered the gold standard [24]. This procedure uses a donor nerve; thus, it poses certain disadvantages. Among them are the formation of neuroma, and the difficulty of a perfect match in structure and size of the graft to the lesion site [24]. In an attempt to minimize these effects, the search for synthetic materials, preferably biodegradable, such as polycaprolactone [11], has been the target of many studies.

In addition, auxiliary therapies have been studied, in order to stimulate the lesion's microenvironment, aiming improve nerve regeneration [9]. Among the molecules that can act as a trophic factor in the lesion environment, the fibrin biopolymer is highlighted, which has shown positive results in the repair of peripheral nerve injuries [14–17,25,26].

The morphological and morphometric analyses of the lesion site (ischiatric nerve), except in group D, showed regeneration in all experimental groups. Most of the parameters analysed showed similarity of values of the treated groups with group S, suggesting nerve regeneration after 90 days. The only difference observed was regarding the axon area, where the PCL group showed lower values when compared to group S. This similarity among the values of the experimental groups was also observed by Cartarozzi et al [15], whose methodology for lesion repair was similar to that performed in this study, with tubulization using PCL and FB. The difference in relation to the present study refers to the experimental period, which, in the cited paper was 60 days, where the treated groups were not equal in values to the control group. In the present study, at 90 days after injury, the values of the experimental groups were similar to those of group S.

Regarding myelin sheath thickness, indicative of axonal regeneration, the values found here are consistent with the results of Iman et al [27], where chitosan-based tubulization was used and nerve regeneration was demonstrated after 12

weeks of nerve repair [27].

The G-Ratio values of the experimental groups were similar to S group, with indexes ranging from 0.4 to 0.6. Values that, according to Mendonça and collaborators, point to the degeneration-regeneration process of nerve fibers [28].

The functional results concerning the fibular index, showed no difference among the experimental groups and group S. A similar observation was noted by Cartarozzi and researchers [15] in a study about injury and repair using PCL+FB, which can be justified by the sensitivity of the Catwalk, and by the study time (90 days), since studies using simpler methodologies for gait assessment and longer experimental periods found differences among the groups [29].

For the other parameters, such as the print area, max contact area and sand rate, there was a reduction in values when compared to group S at the end of the experimental period, results compatible with the literature for neurotmesis type injuries with extensive gap [30]. It is important, however, to emphasize that analyzing the groups separately and comparing their evolution throughout the experimental period, the only group that did not show recovery in the area of paw was group D. This parameter is very representative of functional recovery, since after this type of injury, the animal starts to use almost exclusively the heel to contact the platform, to the detriment of his toes [31]. Recovery of the print area occurred earlier in the FB group (75 days post-injury) compared to the PCL group (90 days post-injury).

In this study, although the motor function analyzed using the Catwalk software (Noldus) showed for some parameters that the animal's walk did not return to the state before the injury, other results point to a morphological regeneration of the ischiatic nerve and the NMJs.

One of the main changes resulting from denervation in NMJs described in the literature is the destabilization of AChRs clusters [32]. In this study, using high-resolution images obtained in a confocal scanning microscope, the *clusters* of AChRs, as well as the endplate, were evaluated in an individualized manner using the new plugin for Image J, the "NMJ morph" [20], which allows through well-characterized steps and software tools, to analyze NMJs in a robust and reliable

way.

According to Jones et al (2016) [20], compactness index is a valid parameter to determine the morphological state of the postsynaptic terminal or endplate, because this index takes into account the area occupied by AChR *clusters* in relation to the endplate area, considering its distribution, and not only its number. Our results showed similarity among the values of the experimental groups when compared to group S, regarding the number of AChR *clusters* and fragmentation. However, the compactness index was different among the groups, and the only group that showed statically similar values to group S was the group FB.

Jones and researchers [20] also proved through an extensive statistical study that variables linked to the size of the NMJs are more accurate to determine alterations in the NMJs. The AChRs and enplate area were shown to be altered in the endplate at 90 days after injury and repair. Only the values of the FB group were similar to those of S group, with the same response pattern already described for the compactness index.

In the average area of the AChRs *clusters*, which takes into account the number and area of these *clusters*, the values of all experimental groups were lower than those presented by group S, indicating that although there are parameters that point to reinnervation of the target organ and post-injury regeneration, it was not complete after 90 days injury.

The morphological analysis from the images obtained, as well as the parameters analysed, point to a greater approximation of the FB group with the S group, which can be observed by the distribution in continuous arms of AChRs, a pattern that characterizes a mature and healthy NMJ [33]. In the NMJs of the D and PCL groups, the AChRs were morphologically sparser with interruptions in the continuity of the arms.

The protein expression profile of the alpha and gamma subunits of AChRs also suggests regeneration, because the values of the experimental groups were similar to those of group S. It is known that soon after nerve injury, there is an increase in the levels of AChRs, which are distributed beyond the synaptic sites [5].

The levels of protein expression of AChRs, presented values about twice

higher than group S, especially in relation to the gamma receptor. These results indicate that even after 90 days, regeneration is still in process. This can be explained by the fact that the nerve impulse is not fully re-established, which alters the release of ACh, and therefore, the levels and distribution of AChRs [34].

The reciprocal relationship between the exacerbated synthesis of AChRs and myogenin after denervation [5] must also be considered, this MRF that showed similar values in all groups. In addition, studies describe that myogenin binds to the promoter region of the genes for MURF1 and atrogin-1(Mafbx) [35], genes that act in the ubiquitin-proteasome pathway, which may increase protein degradation, a common effect in denervation. In the present study, the levels of MURF1 and atrogin-1 were similar among the experimental groups and the S group.

In the FB group there was an increase in the expression of the epsilon subunit, in relation to the other groups. This increase in relation to group S may indicate that there was an incomplete restoration of synaptic sites, since after denervation there is a distribution of AChRs beyond the synaptic sites, which is ceased after full restoration of the nerve impulse (37).

The increase in the mature subunit (epsilon) compared to the other groups can indicate a progress in regeneration, due to the use of FB. The replacement of the denervated (gamma) for the innervated (epsilon) subunit occurs only after fiber reinnervation (only one motor point per fiber) and in differentiated myotubes [36,37]. The reduction observed in MyoD levels in the FB group also indicate a more advanced regeneration phase present.

The possibility that differentiation of myogenic lineage cells into myotubes has already occurred, may justify the reduction in MyoD [38]. Furthermore, considering that the soleus muscle is a predominantly oxidative muscle, and MyoD levels are higher in fast fibers, this decrease suggests a return to a more nearly normal muscle pattern [39].

The Agrin, MuSK, Rapsin and LRP4 proteins, which are involved in the maintenance and stability of the JNMs, collaborate to demonstrate that there was regeneration because the values were similar to those of group S. In relation to Agrin, an increase trend was observed in the PCL group, which may also be related

to the regeneration phase presented by this group, where the NMJs remodels itself to return to the pretzel shape, with continuous arms, whose process is regulated by Agrin [40].

We also highlight the results found in the FB group regarding LRP4 and S100 values. The higher expression of LRP4 protein and S100 (Schwann cells) indicate the probable action of a regeneration pathway, where the LPR4 activates Schwann cells after nerve injury [41]. Perisynaptic Schwann cells, found in muscle in association with the NMJs, act in regeneration after peripheral nerve injury, phagocytizing cellular debris, proliferating, and sending branches to guide reinnervation from nearby innervated junctions, promoting reinnervation of denervated fibers [42–44].

It is important to emphasize the ability of NMJs to maintain their structure even after severe injury, such as that of the experimental model used in this study. In literature, this has been described as a safety factor of the NMJs, term associated with NMJs ability to remain effective under physiological stress [45,46]. The results found in group D reinforces this factor, since some parameters were similar to those of group S although no repair technique was used in group D. This factor is not, however, able to prevent the electrical failure and reduced functional regeneration, common after peripheral nerve injuries [47].

The repair of lesions with high tissue loss using the tubulization technique has shown positive results, as it provides favourable environment for axonal regeneration [11,15,27]. Among the materials used, PCL stands out because it is already approved for use in humans [10]. In addition, its use allows the association of adjuvant therapies to the tube, among them the FB, which, besides having positive results in isolation, is a proven good *scaffold* for stem cells and growth factors [15,48,49]. The positive results found in this study with the addition of biopolymer to tubulization point towards a trophic action of this sealant, being able to accelerate nerve regeneration, probably due to its ability to stimulate the inflammatory process in the lesion microenvironment [50]. This may have accelerated regeneration, as demonstrated by the results referring to the NMJs of the FB group. These presented morphologically and morphometrically (area of

AChRs and endplate, and compactness index) closer to the S group, when compared to the empty tube (PCL). It is important to highlight that even in this group there was an increase of S100, marker of schwann cells, which are known conductors of the nerve regeneration process, and of the epsilon subunit of AChRs, subunit present in mature and innervated fibers.

The results presented in this work add on to those already performed, indicating that the use of polycaprolactone-based conduits is an appropriate technique for severe lesions with great tissue loss. It also allowed the insertion of auxiliary therapies, such as fibrin biopolymer, that promote the NMJs structure maintenance and enhances nerve regeneration.

References

- [1] Zhang RC, Du WQ, Zhang JY, Yu SX, Lu FZ, Ding HM, et al. Mesenchymal stem cell treatment for peripheral nerve injury: A narrative review. *Neural Regeneration Research* 2021;16:2170–6. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.310941>.
- [2] van Nest DS, Kahan DM, Ilyas AM. Polyethylene Glycol Fusion of Nerve Injuries: Review of the Technique and Clinical Applicability. *Journal of Hand and Microsurgery* 2021;13:049–54. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1718651>.
- [3] Furey MJ, Midha R, Xu QG, Belkas J, Gordon T. Prolonged target deprivation reduces the capacity of injured motoneurons to regenerate. *Neurosurgery* 2007;60:723–32. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000255412.63184.CC>.
- [4] Tu H, Zhang D, Corrick RM, Muellemann RL, Wadman MC, Li YL. Morphological regeneration and functional recovery of neuromuscular junctions after tourniquet-induced injuries in mouse hindlimb. *Frontiers in Physiology* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00207>.
- [5] Ma J, Shen J, Garrett JP, Lee CA, Li Z, Elsaidi GA, et al. Gene expression of myogenic regulatory factors, nicotinic acetylcholine receptor subunits, and GAP-43 in skeletal muscle following denervation in a rat model. *Journal of Orthopaedic Research* 2007;25:1498–505. <https://doi.org/10.1002/jor.20414>.
- [6] R W, S J, LN N, PJ K. Investigation of the Expression of Myogenic Transcription Factors, microRNAs and Muscle-Specific E3 Ubiquitin Ligases in the Medial Gastrocnemius and Soleus Muscles following Peripheral Nerve Injury. *PloS One* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0142699>.
- [7] Seddon HJ. A classification of nerve injuries. *British Medical Journal* 1942;2:237. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4260.237>.
- [8] Wilcox M, Gregory H, Powell R, Quick TJ, Phillips JB. Strategies for Peripheral Nerve Repair. *Current Tissue Microenvironment Reports* 2020;1:49–59. <https://doi.org/10.1007/s43152-020-00002-z>.
- [9] Kubiak CA, Kung TA, Brown DL, Cederna PS, Kemp SWP. State-of-The-Art techniques in treating peripheral nerve injury. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2018;141:702–10. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000004121>.
- [10] Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. *Injury* 2012;43:553–72. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.030>.
- [11] Assaf K, Leal CV, Derami MS, de Rezende Duek EA, Ceragioli HJ, de Oliveira ALR. Sciatic nerve repair using poly(ε-caprolactone) tubular prosthesis associated with nanoparticles of carbon and graphene. *Brain and Behavior* 2017;7. <https://doi.org/10.1002/brb3.755>.
- [12] Félix SP, Pereira Lopes FR, Marques SA, Martinez AMB. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. *Microsurgery* 2013;33:468–77. <https://doi.org/10.1002/micr.22109>.
- [13] Buchaim DV, Cassaro CV, Shindo JVTC, Coletta BB della, Pomini KT, de Oliveira Rosso MP, et al. Unique heterologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties: A systematic review. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 2019;25. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0038>.
- [14] Buchaim RL, Andreo JC, Barraviera B, Ferreira Junior RS, Buchaim DV, Rosa Junior GM, et

- al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury* 2015;46:655–60. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.01.031>.
- [15] Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira RS, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, et al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Research Bulletin* 2015;112:14–24. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.01.005>.
- [16] Leite APS, Pinto CG, Tibúrcio FC, Sartori AA, de Castro Rodrigues A, Barraviera B, et al. Heterologous fibrin sealant potentiates axonal regeneration after peripheral nerve injury with reduction in the number of suture points. *Injury* 2019;50:834–47. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.03.027>.
- [17] Pinto CG, Leite APS, Sartori AA, Tibúrcio FC, Barraviera B, Junior RSF, et al. Heterologous fibrin biopolymer associated to a single suture stitch enables the return of neuromuscular junction to its mature pattern after peripheral nerve injury. *Injury* 2020;52:731–7. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.10.070>.
- [18] Evans GRD, Brandt K, Niederbichler AD, Chauvin P, Hermann S, Bogle M, et al. Clinical long-term in vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2000;11:869–78. <https://doi.org/10.1163/156856200744066>.
- [19] Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 2017;18. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>.
- [20] Jones RA, Reich CD, Dissanayake KN, Kristmundsdottir F, Findlater GS, Ribchester RR, et al. NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure–function relationships at the neuromuscular junction. *Open Biology* 2016;6. <https://doi.org/10.1098/RSOB.160240>.
- [21] Sobrall LL, Oliveira LS, Takeda SYM, Somazz MC, Montebelo MIL, Teodori RM. Immediate versus later exercises for rat sciatic nerve regeneration after axonotmesis: Histomorphometric and functional analyses. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 2008;12:311–6. <https://doi.org/10.1590/s1413-35552008000400010>.
- [22] ZAR JH. *Biostatistical analysis*, 4th impression. Dorling Kindersley (India) Pvt Ltd, Delhi, 2009;110:92.
- [23] Johnson R, Wichern D. *Applied multivariate statistical analysis* 2002.
- [24] Narayan SK, Arumugam M, Chittoria R. Outcome of human peripheral nerve repair interventions using conduits: a systematic review. *Journal of the Neurological Sciences* 2019;396:18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.10.012>.
- [25] Biscola NP, Cartarozzi LP, Ulian-Benitez S, Barbizan R, Castro MV, Spejo AB, et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 2017;23. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0103-1>.
- [26] Kempe PRG, Chiarotto GB, Barraviera B, Ferreira RS, de Oliveira ALR. Neuroprotection and immunomodulation by dimethyl fumarate and a heterologous fibrin biopolymer after ventral root avulsion and reimplantation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 2020;26. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0093>.
- [27] Iman M, Araghi M, Panahi Y, Mohammadi R. Effects of Chitosan-Zinc Oxide Nanocomposite Conduit on Transected Sciatic Nerve: An Animal Model Study. *Bulletin of*

- Emergency and Trauma 2017;5:240–8. <https://doi.org/10.18869/acadpub.beat.5.4.521>.
- [28] Mendonça AC, Barbieri CH, Mazzer N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 2003;129:183–90. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(03\)00207-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(03)00207-3).
- [29] Maciel FO, Viterbo F, Chinaquede L de FC, Souza BM. Effect of electrical stimulation of the cranial tibial muscle after end-to-side neurorrhaphy of the peroneal nerve in rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 2013;28:39–47. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502013000100007>.
- [30] Bozkurt A, Scheffel J, Brook GA, Joosten EA, Suschek C v., O'Dey DM, et al. Aspects of static and dynamic motor function in peripheral nerve regeneration: SSI and CatWalk gait analysis. *Behavioural Brain Research* 2011;219:55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.12.018>.
- [31] R D, RJ J, MA M, EA J. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. *Journal of Neuroscience Methods* 2007;164:120–30. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2007.04.009>.
- [32] Kurimoto S, Jung J, Tapadia M, Lengfeld J, Agalliu D, Waterman M, et al. ACTIVATION OF THE WNT/ β -CATENIN SIGNALING CASCADE AFTER TRAUMATIC NERVE INJURY HHS Public Access. *Neuroscience* 2015;294:101–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.049>.
- [33] Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW. From plaque to pretzel: Fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience* 2000;20:3663–75. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-10-03663.2000>.
- [34] Rodríguez Cruz PM, Cossins J, Beeson D, Vincent A. The Neuromuscular Junction in Health and Disease: Molecular Mechanisms Governing Synaptic Formation and Homeostasis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2020;13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.610964>.
- [35] V M, AH W, E M, JM F, MJ P, J M, et al. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell* 2010;143:35–45. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.09.004>.
- [36] G L, KA S, DE M. Novel role for cyclin-dependent kinase 2 in neuregulin-induced acetylcholine receptor epsilon subunit expression in differentiated myotubes. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280:21731–8. <https://doi.org/10.1074/JBC.M412498200>.
- [37] CA B, SJ T. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2005;16:585–95. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2005.07.006>.
- [38] L M, AJ W, B P, Y C, A T, CB M, et al. Pbx homeodomain proteins direct Myod activity to promote fast-muscle differentiation. *Development (Cambridge, England)* 2007;134:3371–82. <https://doi.org/10.1242/DEV.003905>.
- [39] TT K, T M, JR S. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Current Opinion in Neurobiology* 2006;16:74–82. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2005.12.003>.
- [40] Bolliger MF, Zurlinden A, Lüscher D, Bütikofer L, Shakhova O, Francolini M, et al. Specific proteolytic cleavage of agrin regulates maturation of the neuromuscular junction. *Journal of Cell Science* 2010;123:3944–55. <https://doi.org/10.1242/jcs.072090>.
- [41] Gribble KD, Walker LJ, Saint-Amant L, Kuwada JY, Granato M. The synaptic receptor Lrp4 promotes peripheral nerve regeneration n.d. <https://doi.org/10.1038/s41467-018->

- 04806-4.
- [42] Martineau É, Arbour D, Vallée J, Robitaille R. Properties of glial cell at the neuromuscular junction are incompatible with synaptic repair in the SOD1G37R ALS mouse model. *Journal of Neuroscience* 2020;40:7759–77. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1748-18.2020>.
 - [43] Cunningham ME, Meehan GR, Robinson S, Yao D, McGonigal R, Willison HJ. Perisynaptic Schwann cells phagocytose nerve terminal debris in a mouse model of Guillain-Barré syndrome. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2020;25:143–51. <https://doi.org/10.1111/jns.12373>.
 - [44] Kang H, Tian L, Thompson WJ. Schwann cell guidance of nerve growth between synaptic sites explains changes in the pattern of muscle innervation and remodeling of synaptic sites following peripheral nerve injuries. *Journal of Comparative Neurology* 2019;527. <https://doi.org/10.1002/cne.24625>.
 - [45] RL R. Endplate contributions to the safety factor for neuromuscular transmission. *Muscle & Nerve* 2011;44:854–61. <https://doi.org/10.1002/MUS.22177>.
 - [46] SJ W, CR S. Safety factor at the neuromuscular junction. *Progress in Neurobiology* 2001;64:393–429. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00055-1).
 - [47] Sakuma M, Gorski G, Sheu SH, Lee S, Barrett LB, Singh B, et al. Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. *European Journal of Neuroscience* 2016;43:451–62. <https://doi.org/10.1111/ejn.13059>.
 - [48] Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga FC, Oliveira ALR, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy* 2014;5. <https://doi.org/10.1186/scrt467>.
 - [49] Rodríguez Sánchez DN, de Lima Resende LA, Boff Araujo Pinto G, de Carvalho Bovolato AL, Possebom FS, Deffune E, et al. Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Enhance Neuroregeneration in a Rat Model of Sciatic Nerve Crush Injury. *Cell Transplantation* 2019;28:47–54. <https://doi.org/10.1177/0963689718809045>.
 - [50] Spejo AB, Chiarotto GB, Ferreira ADF, Gomes DA, Ferreira RS, Barraviera B, et al. Neuroprotection and immunomodulation following intraspinal axotomy of motoneurons by treatment with adult mesenchymal stem cells. *Journal of Neuroinflammation* 2018;15. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1268-4>.

Anexos



Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

unesp

CERTIFICADO Nº 1244/2017-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação das repercussões da reconstrução nervosa via sutura ou selante de fibrina (CEVAP) sobre as junções neuromusculares e proteínas associadas aos 30,90 e 120 dias após lesão"- Pesquisador: Ana Paula Silveira Leite – Orientador: Selma Maria Michelin Matheus – Colaborador: Carina Giudi Pinto, registrada com o nº 1244/2017, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 28 de setembro de 2017.

Finalidade (X) Ensino () Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	28/02/2021
Espécie/Linhagem/Raça	Rato Wistar
Nº de animais	80
Peso/Idade	150-300g – 40 dias
Sexo	80 Machos
Origem	Biotério Central da UNESP - FMB

Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da CEUA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA