

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/02/2021.



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

FACULDADE DE MEDICINA

Carina Guidi Pinto

**Análise dos receptores de acetilcolina e proteínas
associadas no reparo de nervo periférico após uso de
selante de fibrina e neurorrafia: estudo experimental em
ratos**

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 Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador (a): Profa. Associada Selma Maria Michelin Matheus
Coorientadora: Profa. Dra. Samara Camaçari de Carvalho

**Botucatu
2019**

Carina Guidi Pinto

Análise dos receptores de acetilcolina e proteínas associadas no reparo de nervo periférico após uso de selante de fibrina e neurorrafia: estudo experimental em ratos

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 Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador (a): Profa. Associada Selma Maria Michelin Matheus

Coorientadora: Profa. Dra. Samara Camaçari de Carvalho

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Pinto, Carina Guidi.

Análise dos receptores de acetilcolina e proteínas associadas no reparo de nervo periférico após uso de selante de fibrina e neurorrafia : estudo experimental em ratos / Carina Guidi Pinto. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Selma Maria Michelin Matheus
Coorientador: Samara Camaçari de Carvalho
Capes: 20600003

1. Junção neuromuscular. 2. Adesivo tecidual de fibrina. 3. Nervos periféricos.

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

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvia e Luiz, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida e que sempre me mostraram que as dificuldades aparecem para serem superadas.

Agradecimentos

*Primeiramente agradeço a **Deus**, pelo dom da vida, por me guiar nesta jornada sempre me fortalecendo.*

*A **minha família**, ofereço todas as minhas conquistas. **Meus pais**, meus exemplos de dedicação e amor. A **minha amada irmã, Camila** pelo carinho, por dividir todos os momentos e pela cumplicidade de sempre e a **minha avó Marli**, pelo afeto e preocupação. E aos demais familiares que mesmo com a distância torceram por mim. Amo todos vocês!*

*Ao **Carlos Eduardo**, meu namorado, companheiro, amigo e confidente. Sempre me apoiando, ouvindo, incentivando e ajudando nas realizações dos meus sonhos e objetivos. Muito obrigada, você foi e sempre será fundamental para meu crescimento. Te amo.*

*A minha orientadora, **Professora Dr^a Selma M. M. Matheus**, muito mais que uma orientadora! Agradeço por toda confiança, dedicação, carinho, profissionalismo e aprendizado, durante estes cinco anos da minha vida acadêmica. Passamos momentos alegres e de muitas risadas, porém alguns momentos tristes e difíceis, mas você sempre esteve junto em todos eles para apoiar e incentivar. Você é um exemplo de pessoa, profissional e pesquisadora. Obrigada por tudo!*

*À minha co-orientadora, **Prof^aDr^a Samara C. de Carvalho** pelo carinho, apoio e ensinamento, que mesmo longe esteve presente tornando possível a realização desse trabalho.*

*Ao **professor Dr^o André LuisFiladelpho**, pelo auxílio com o protocolo cirúrgico deste estudo, sempre com muita paciência e dedicação me ensinado cada etapa, muito obrigada.*

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

*Ao programa de **Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia**, ao **Instituto de Biociências, da UNESP de Botucatu** e a **Unidade de pesquisa experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNIPEX/FMB)**, pela estrutura e apoio para a realização deste trabalho.*

*Á todos os **professores e funcionários do departamento de Anatomia/IBB** pelo auxílio, companheirismo, incentivo e amizade, durante esses cinco anos.*

*Aos **funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica**, em especial a Shelly e Elton por todo auxílio*

*Aos **funcionários da Unipex**, pelo acompanhamento, ensinamentos e apoio nas cirurgias, em especial ao **Bardella, Zé, Robson, Sílvio e Diego** por todo o cuidado com os animais utilizados neste estudo.*

*A **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos e a **FAPESP(2017-06472-2)** pela concessão de auxílio pesquisa e aos **animais** desse experimento pelas vidas doadas que engrandeceram a ciência.*

*Ao **Professor José Eduardo Corrente** pela realização e ajuda com todas as análises estatísticas.*

*Aos **amigos do laboratório de Anatomia**, pela amizade, apoio, pelo incentivo, dedicação, companheirismo nas horas mais difíceis e pelas risadas nos momentos de alegria. Vocês têm uma contribuição em mais esta etapa vencida.*

*A minha querida **amiga Ana Paula**, pela convivência diária, você foi de extrema importância para a realização deste trabalho e grande exemplo de dedicação, respeito, amizade, simplicidade e profissionalismo. Aprendi muito com você. E também aos **amigos Felipe, Talita e Marília**, que me ouviram, ajudaram e deixaram minha jornada mais leve e divertida. Obrigada pela convivência dentro e fora da UNESP, por todo carinho e atenção! Vocês são muito especiais na minha vida.*

*Aos **membros das bancas de qualificação e defesa** pela disponibilidade em estar presente neste momento e pelas colaborações fundamentais para este trabalho. Muito obrigada.*

Este momento jamais seria o mesmo sem o apoio e incentivo dos meus colegas, amigos e familiares, que estão presentes, fisicamente ou virtualmente, nos momentos de dificuldades tornando-os mais leves e fazendo os meus dias mais alegres.

Um sorriso pode mudar um dia e por isso sou grata a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

MUITO OBRIGADA.

Epígrafe

“Sonhar é um dos princípios mais básicos e fundamentais da essência do ser humano, é condição, é imposição.

Sonhar é vida e conquistar um sonho é como conquistar um pedaço da vida; é realização e é triunfo!

Mas nada disso será possível sem que lutemos por isso, sem que haja persistência, sem que sejamos fiéis aos nossos sonhos e deles nunca desistamos. ”

(Professor Galvão)

Resumo

As lesões nervosas periféricas (LNPs) levam a uma perda da conexão entre o axônio e o músculo, ocasionando interrupção na transmissão do impulso nervoso e alterações nas junções neuromusculares (JNMs). O reparo das LNPs através da neurografia é um método amplamente utilizado, porém a recuperação tanto morfológica e funcional é incompleta, sendo um desafio para a clínica médica. Diante disso métodos alternativos como uso de selante de fibrina vêm sendo utilizados para minimizar danos e acelerar a recuperação nervosa e muscular, havendo poucas referências em relação às JNMs. O objetivo deste estudo foi verificar se o uso do selante de fibrina associado a um ponto de sutura atinge ou supera os resultados da sutura convencional após LNP com foco nos receptores de acetilcolina (nAChRs) e proteínas associadas às JNMs no músculo sóleo. Foram utilizados 40 ratos Wistar machos adultos (CEUA: 1173/2016), divididos em 4 grupos: Controle-Sham (CS), Controle-Desnervado (CD), Lesão Sutura (LS) e Lesão Sutura + Selante de Fibrina (LSS). No grupo CS foi realizada incisão, afastamento da musculatura e localização do nervo isquiático direito. No grupo CD foi realizada neurotome (gap de 6 mm). Nos grupos CD, LS e LSS foi realizada fixação dos cotos na musculatura após a neurotome. Após 7 dias foi realizada reconexão dos cotos com três pontos de sutura no grupo LS e no grupo LSS um ponto de sutura foi associada ao selante de fibrina (CEVAP). Após 60 dias os animais foram eutanasiados, os músculos sóleos removidos e analisados através de microscopia confocal para obter a morfologia e morfometria dos nAChRs (α -bungaratoxina) e a morfologia do terminal nervoso (NF200) e através do Western Blotting para obter a quantificação proteica dos nAChRs (α 1, ϵ e γ), S100, Agrina, MMP-3, MuSK e Rapsina. A análise qualitativa da microscopia confocal no grupo CS mostrou nAChRs com distribuição compatível com a normalidade com braços contínuos e terminais nervosos íntegros, preservados e sem descontinuidade. No grupo CD foi observado achatamento na placa motora, fragmentação dos nAChRs, com distribuição em "ilhas" e terminais nervosos emaranhados. Nos grupos LS e LSS a morfologia mostrou-se intermediária entre os grupos CS e CD, com terminais nervosos mais delgados. Os dados morfométricos foram compatíveis com a morfologia, nos grupos LS e LSS apresentaram valores intermediários entre os grupos CS e CD e houve aumento da área relativa planar dos grupos LS e LSS, evidenciando uma menor fragmentação dos nAChRs. Os valores encontrados na expressão proteica nos grupos LS e LSS foram semelhantes ao CS. Neste estudo foi observado que após reconstrução nervosa, nos grupos LS e LSS houve um retorno dos nAChRs ao estágio maduro, justificado pela expressão proteica da subunidade ϵ (madura). Valores inversos foram encontrados para a subunidade γ (imatura, desnervada). Desse modo pode-se concluir que houve semelhança entre os grupos com reconstrução nervosa evidenciando a recuperação após reconexão dos cotos nervosos, considerando que houve retorno da estrutura morfológica com menor fragmentação dos nAChRs e retorno das proteínas associadas à JNM ao seu padrão maduro e o selante de fibrina com a redução do número de pontos de sutura mostrou-se promissor com um retorno acentuado da subunidade relacionada ao padrão imaturo-desnervado do receptor.

Abstract

Peripheral nerve lesions (PNLs) lead to a loss of the connection between axons and muscle, resulting in the interruption of the transmission of nerve impulses and alterations in the neuromuscular junctions (NMJs). The repair of PNLs through neuroorrhaphy is a widely utilized method, however the recuperation of both morphology and function is incomplete, challenging medical clinic. Thus, alternative methods such as the usage of fibrin sealants have been utilized to minimize damages and accelerate nerve and muscular recuperation, with few references in relation to NMJs. The objective of this study was to verify if the use of fibrin sealants associated to a stitch of suture reaches or surpasses the results of traditional suture after PNLs with focus in the acetylcholine receptors (nAChRs) and proteins associated to the NMJs in the soleus muscle. Forty male adult Wistar rats were utilized (CEUA: 1173/2016), divided into 4 groups: Sham-Control (SC), Denervated-Control (DC), Suture Lesion (SL) and Suture Lesion + Fibrin Sealant (SFS). In SC group, it was performed incision, muscle spacing and identification of the right sciatic nerve. In DC group, it was performed neurotmesis (gap of 6 mm). In DC, SL and SFS groups, it was carried out fixation of stumps on the musculature after neurotmesis. After 7 days the reconnection of the stumps with suture was accomplished in SL group and in SFS group the suture was associated with the fibrin sealant (CEVAP). After 60 days the animals were euthanized, soleus muscles were removed and analyzed by confocal microscopy to obtain the morphology and morphometry of the nAChRs (α -bungaratoxin) and the morphology of the nerve terminal (NF200) and by western blotting to obtain the quantification of nAChRs (α 1, ϵ e γ), S100, Agrin, MMP-3, MuSK and Rapsin. The qualitative assessment showed in SC group that nAChRs presented a normal morphology with continuous branches and preserved nerve terminals. In DC group it was observed flattening of the neuromuscular junction, fragmentation of nAChRs, with distribution in "islands" and tangled nerve terminals. In SL and SFS groups, the morphology was in-between groups SC and DC, with thinner nerve terminals. The morphometric data were compatible with the morphology and the majority of the parameters of SL and SFS groups presented values in-between the SC and DC groups. There was an increase of relative planar area in the reconstruction groups, highlighting that there was less nAChRs fragmentation. The values found in the protein expression in SL and SFS groups were similar to SC group and showed a return of the nAChRs mature pattern justified for the ϵ subunit expression. Inverse values were found in γ subunit. Based on the similarity of observed results in reconstruction groups, it was possible to conclude that there was a return of both nAChRs morphology and associated proteins to the mature pattern. The fibrin sealant associated with reduced number of stitches was viable due to the smaller values of immature receptor (γ) expression compared to the suture group.

Sumário

Lista de Figuras.....	11
Lista de Abreviações	12
1.0 Introdução	13
1.1 Junção Neuromuscular (JNM).....	13
1.1.1 Agrina.....	22
1.1.2 Receptor lipoprotéico relacionado a proteína 4 (Lrp4)	23
1.1.3 Receptor tirosina quinase músculo-específico (MuSK).....	24
1.1.4 Rapsina.....	25
1.1.5 Metaloproteinase de matriz - 3 (MMP-3).....	25
1.2 Lesões nervosas periféricas (LNPs) e Junção Neuromuscular (JNM)	26
1.3 Reparação nervosa após lesões nervosas periféricas	29
2.0 Objetivos	31
2.1 Objetivos Específicos	31
3.0 Materiais e Métodos	31
3.1 Animais de experimentação	31
3.2 Protocolo cirúrgico	31
3.3 Microscopia Confocal para nAChR e Terminal Nervoso	33
3.4 Análise da expressão proteica por Western Blotting.....	34
4.0 Análise estatística	35
Referências Bibliográficas.....	36
Capítulo 1 - The association between fibrin sealant to a single stitch of suture promotes the return of morphology and neuromuscular junction structure to the mature pattern after nerve peripheral lesion.....	45
Anexo 1 – Certificado CEUA	71

Lista de figuras e Tabelas

Figura 1 – Desenvolvimento e consolidação das junções neuromusculares. (Página 14)

Figura 2 – Morfologia da junção neuromuscular. Desde a origem do neurônio motor na medula espinal até a inervação na fibra muscular. (Página 15)

Figura 3 – Junção neuromuscular adulta. (A) o compartimento pré-sináptico; (B) o compartimento extracelular ou fenda sináptica; (C) o compartimento pós-sináptico. (Página 16)

Figura 4- Detalhe da região pós-sináptica – dobras juncionais: Ápice (receptores de acetilcolina), Fundo (Canais de Sódio). Outras proteínas incluindo Agrina, MuSK, Rapsina que estão envolvidas no agrupamento dos receptores de acetilcolina estão presentes no sarcolema próximo aos receptores. (Página 18)

Figura 5- Maturação da junção neuromuscular. (Página 19)

Figura 6- Estrutura dos receptores de acetilcolina. (Página 19)

Figura 7- Ação coordenada de sinais positivos e negativos na junção neuromuscular. (Página 21)

Figura 8- Interação específica das proteínas Agrina/Lrp4/MusK/Rapsina com os receptores de acetilcolina no sarcolema da fibra muscular. (Página 22)

Figura 9- Fotografias das técnicas cirúrgicas utilizadas em todos os grupos experimentais. **A-** Incisão. **B-** Localização do Nervo Isquiático (seta). **C-** Neurotome. **D-** Visualização do coto proximal e distal após 7 dias. **E-** Detalhe da neurorrafia (seta-sutura). **E-** Detalhe da neurorrafia associada ao selante de fibrina (seta-coágulo formado pelo selante). (Página 33)

Tabela 1. Relação de anticorpos primários e secundários. (Página 35)