

Inflamação do tipo corpo estranho reduz respostas regenerativas após lesão nervosa periférica

Foreign body inflammation diminished repair responses after peripheral nerve injury

La inflamación de cuerpos extraños reduce las respuestas regenerativas después de una lesión nerviosa periférica

Ana Cláudia Moreira dos Santos^{1*}, Alex Dias Assis^{2*}, Táríka Gonçalves do Carmo Oliveira¹, Simone Ramos Deconte³, Érica dos Santos Vieira⁴, Ayrton Senna Couto Valverde⁴, Vinicius Freitas Fernandes⁴, Fernanda de Assis Araújo⁵, Gustavo Ferreira Simões⁶, Renata Graciele Zanon⁵

*Ana Cláudia Moreira e Alex Dias Assis contribuíram igualmente para esse trabalho.

1.Mestranda em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia-UFU, Uberlândia-MG, Brasil.

2.Doutorando em Biologia Celular e Estrutural, Universidade de Campinas-Unicamp. Campinas-SP, Brasil.

3.Doutora em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia-UFU. Uberlândia-MG, Brasil.

4.Graduandos, Universidade Federal de Uberlândia-UFU. Uberlândia-MG, Brasil.

5.Professora Associada, Universidade Federal de Uberlândia-UFU. Uberlândia-MG, Brasil.

6.Professor Doutor, Faculdade de Medicina Santa Casa São Paulo. São Paulo-SP, Brasil.

Resumo

Introdução. A resposta ao corpo estranho resulta de um estímulo inflamatório persistente o qual é mediado por várias linhagens celulares. A presença de células inflamatórias influencia diretamente o comportamento das células de Schwann (CS). **Método.** Nesse sentido, nós estudamos a interação entre o processo inflamatório crônico e o processo degenerativo/regenerativo no nervo. Para tanto, usamos um modelo experimental de reação de corpo estranho induzida por implantes de esponja de poliéster-poliuretano ao redor do nervo ciático de camundongos após lesão por esmagamento. Interações *in vitro* entre as CS e exsudatos da esponja também foram estudadas. **Resultados.** Os resultados mostraram um grande infiltrado inflamatório com predominância de macrófagos. CS foram observadas dentro da esponja. Nos nervos envoltos por esponja foram observados reduzida expressão de NGFRp75, maior produção de colágeno, reduzido número de fibras degeneradas e da razão *g*, pior recuperação funcional. Além disso, os resultados *in vitro* demonstraram que macrófagos influenciaram a expressão de NGFRp75. **Conclusão.** Esses resultados indicam disfunção da limpeza da mielina e prejuízo na remielinização em nervos envoltos por esponja.

Unitermos. crescimento axonal; inflamação; macrófago; célula de Schwann; degeneração Walleriana; esponja

Abstract

Introduction. The foreign body response results from persistent inflammatory stimuli which are mediated by the various cell lineages. The presence of inflammatory cells directly influences the behavior of Schwann cells (SC). **Method.** In this sense, we studied the interaction of the chronic inflammatory process and degenerative/regenerative processes in the nerve. For that, we used an experimental model of foreign body reaction induced by polyether-polyurethane sponge implants around the sciatic nerve of mice after crush injury. *In vitro* interaction between SC and exudates from sponges also was studied. **Results.** Results showed the sponge presented great inflammatory infiltrate with predominance of macrophages. SC were observed inside the sponge. In the sponge wrapped nerves we

observed lower expression of p75NGFR, increased collagen production, lower number of degenerate fibers and *g*-ratio, worse nerve functional recovery. Furthermore, in vitro results demonstrated macrophage influence on p75NGFR expression. **Conclusion.** These results indicate dysfunction of the myelin cleaning and failure of the remyelization in sponge wrapped nerves.

Keywords. axonal growth; inflammation; macrophage; schwann cell; wallerian degeneration; sponge

Resumen

Introducción. La respuesta de cuerpo extraño es el resultado de un estímulo inflamatorio persistente que está mediado por varias líneas celulares. La presencia de células inflamatorias influye directamente en el comportamiento celular de Schwann (CS). **Método.** En este sentido, estudiamos la interacción entre el proceso inflamatorio crónico y el proceso degenerativo/ regenerativo en el nervio. Para esto, utilizamos un modelo experimental de reacción de cuerpo extraño inducida por implantes de esponja de poliéster-poliuretano alrededor del nervio ciático de ratones después de una lesión por aplastamiento. También se estudiaron las interacciones in vitro entre SC y exudados de esponjas. **Resultados.** Los resultados mostraron un gran infiltrado inflamatorio con predominio de macrófagos. Se observaron CS dentro de la esponja. En los nervios envueltos en esponja, se observó una expresión reducida de NGFRp75, una mayor producción de colágeno, un número reducido de fibras degeneradas y una relación *g*, peor recuperación funcional. Además, los resultados in vitro demostraron que los macrófagos influyeron en la expresión de NGFRp75. **Conclusión.** Estos resultados indican disfunción de la limpieza de mielina y alteración de la remielinización en los nervios envueltos en esponja.

Palabras clave. crecimiento axonal; inflamación; macrófago; Célula de Schwann; degeneración; esponja

Trabalho realizado no Departamento de Anatomia Humana, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG, Brasil.

Conflito de interesse: não

Recebido em: 21/08/2019

Aceito em: 15/10/2019

Endereço de correspondência: Renata G Zanon, Departamento de Anatomia Humana, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). CP 592, CEP 38400-902, Uberlândia-MG, Brasil. Tel: (55) (34) 99124289. Email: rezanon@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Após o esmagamento de um nervo periférico, a lâmina basal ao redor das unidades constituídas pelo axônio e célula de Schwann (CS) está intacta, e, o axônio é seccionado em dois segmentos, um proximal que permanece dentro de sua bainha de lâmina basal nativa e regenera em direção ao órgão denervado, um segmento distal no qual ocorre um conjunto de eventos denominado Degeneração Walleriana (DW). O neurofisiologista inglês Augustus Waller¹ descreveu em 1850 as mudanças que

ocorrem nos axônios separados do corpo neuronal. O processo se inicia (24 a 48 horas) pela degradação da mielina e proliferação da CS. Logo após, ocorre a invasão de células imunes, especialmente macrófagos. Macrófagos invadem o local da lesão e atingem um pico em sete dias. No entanto, no local da lesão, os macrófagos residentes já estão ativos nas primeiras 24 horas e os neutrófilos também podem ser vistos localmente^{2,3}.

Independentemente do tempo que dura a DW, o importante é que após a lesão do nervo periférico, o coto distal degenera enquanto as CS proliferam e desdiferenciam para criar um ambiente permissivo para a regeneração axonal. Isso é, após a lesão, as CS perdem seu padrão característico de expressão gênica, passando por uma desdiferenciação, e, ao mesmo tempo, ativam um fenótipo relacionado ao reparo⁴. As CS de reparo adotam uma morfologia bipolar alongada e se alinham em colunas formando as bandas de Büngner que servem como túneis dentro dos quais os novos axônios crescem^{2,4}. Paralelamente, as CS aumentam a expressão de fatores que estimulam o crescimento axonal e apresentam maior quantidade de marcadores característicos de CS imaturas, como o receptor neurotrófico p75 (NGFRp75) e a proteína ácida fibrilar glial (GFAP)^{2,4,5}.

A presença de células do sistema imune inato (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e adaptativo (células T e B), desempenham importante papel, porém ainda não tão bem compreendido, na degeneração e

regeneração do sistema nervoso periférico (SNP)⁶⁻⁸. Assim, o sucesso da regeneração axonal periférica está associado a uma presença eficiente e persistente de células do sistema imune responsáveis pelas reações inflamatórias que se iniciam poucas horas após a lesão do nervo periférico.

Nesse contexto, uma melhor compreensão da interação entre inflamação e degeneração/regeneração do SNP pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes. Diante disso, o modelo de inflamação do tipo corpo estranho utilizando pequenos pedaços de esponja de poliuretano, inicialmente descrito por Grindlay e Waugh⁹ e modificado por Andrade *et al.*¹⁰, pode servir como uma boa ferramenta para o estudo da interação entre SNP e inflamação. A esponja implantada induz uma reação inflamatória com formação de tecido de granulação rico em células inflamatórias, novos vasos sanguíneos e matriz extracelular. O uso de implantes de esponja permite tanto o estudo do infiltrado inflamatório, angiogênese e deposição de matriz extracelular, como também a análise bioquímica dos fluidos coletados⁹⁻¹¹. Podendo contribuir para o melhor entendimento da interação entre as células imunes e o microambiente do nervo após lesão.

MÉTODO

Procedimentos *in vivo*

Cinqüenta camundongos *Swiss* machos (6-8 semanas, ~25g) foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h com alimento e água *ad libitum*. Todos os experimentos com animais foram conduzidos seguindo as diretrizes nacionais e internacionais sobre proteção de animais e também foram aprovados pelo Comitê de ética local (CEUA/Protocolo UFU 060/13). Os animais foram divididos em dois grupos: GRUPO CONTROLE (CT), composto por 25 animais submetidos à compressão do nervo ciático, e, GRUPO ESPONJA (SP, *sponge group*), composto por 25 animais submetidos à mesma lesão e um fragmento de esponja (3x7x1mm, Comprimento x Largura x Espessura) colocado envolvendo o local lesionado. Para a cirurgia, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (1:1; 0,10ml/25g, IP) e submetidos a uma lesão por esmagamento, usando pinça de ponta fina número 4 e pressão constante por 20s no nervo ciático esquerdo próximo ao forame obturado¹². A pata contralateral foi utilizada como controle interno.

Pegadas de 10 animais de cada grupo foram utilizadas para o cálculo do Índice Funcional do Ciático (SFI, *sciatic functional index*), conforme descrito por Inserra *et al.*¹³. As análises foram realizadas três dias antes da lesão e 2, 4, 8, 12, 14 e 21 dias após a cirurgia. Os valores do SFI foram apresentados em gráfico linear com comparação estatística entre CT e SP considerando $p < 0,05$.

Todas as outras análises foram realizadas após 14 dias de esmagamento do nervo. Para este propósito, os animais foram anestesiados (como descrito acima) e submetidos à eutanásia através de perfusão transcardíaca com solução salina tamponada com fosfato (20ml, tampão fosfato 0,1M mais 0,9% NaCl, pH 7,4; PBS) e solução fixadora (20ml, formaldeído 3,7% ou Karnovsky: glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 0,5% em PBS). Os nervos ciáticos de ambos os lados, contra e ipsilaterais à lesão, foram extraídos. O nervo foi removido de modo a deixar o local da lesão na região média do segmento nervoso. O material perfundido com formaldeído foi congelado a -40°C em isopentano. Secções longitudinais e transversais dos nervos foram obtidas utilizando um criostato (-25°C, Microm, Heidelberg, Alemanha). Os nervos perfundidos de Karnovsky foram embebidos em resina epóxi (EMbed812, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA).

Para realizar a imunofluorescência, lâminas histológicas de oito animais de cada grupo foram aclimatadas à temperatura ambiente, imersas e lavadas em PBS e então incubadas em câmara umedecida com 150µl de solução de albumina bovina a 5% em PBS por 1h. Os anticorpos primários foram adicionados e incubados por 12-18h a 4°C: (camundongo anti-neurofilamento, 1:200 [Sigma-Aldrich, N2912, St Louis, EUA], coelho anti-S100beta, 1:200 [Abcam, AB868, Cambridge, UK], coelho anti-NGFRp75, 1:400 [Sigma-Aldrich, N3908], marcador de

macrófagos camundongo anti-IBA-1, 1:100 [Imuny, Campinas, Brazil, IM0565], marcador de linfócitos T hamster anti-CD3 conjugado com FITC, 1:200 [BD Pharmingen, San Jose, EUA, 553061], marcador de linfócitos B rato anti-CD19 conjugado com APC-CyTM7, 1:200 [BD Pharmingen, 557655], camundongo anti-neutrófilo (ANCA) 1:100 [Imuny, IM0673]). Para anticorpos não conjugados, após a primeira incubação, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados com partículas fluorescentes (Alexa Fluor 488 ou 594, Jackson Laboratories, PA, EUA) por 1h. Todas as lâminas foram enxaguadas e montadas com lamínula em glicerol/PBS (1:1) contendo DAPI (4'-6'-diamino-2-fenil-indole, marcador nuclear, Sigma-Aldrich). O material foi então examinado e documentado usando um microscópio de fluorescência (TS-100, Nikon, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital (OPT 12MP FLUO, Opticam, GA, EUA). Para cada animal, três imagens representativas foram capturadas a partir de seções dos nervos esquerdos imediatamente distalmente ao local de esmagamento do nervo. Adicionalmente, a esponja ao redor do nervo foi fotografada. As imagens foram analisadas quantitativamente por densidade de pixels usando o *software* ImageJ (versão 1.51n, Instituto Nacional de Saúde Wayne Rasband, EUA) por um avaliador "cego". A média para cada grupo foi calculada e a comparação entre esses valores foi realizada. Todos os resultados foram expressos como média±erro padrão. Valores de $p < 0,05$

foram considerados significantes. Para os marcadores de neurofilamentos e células imunes, apenas a análise qualitativa foi realizada.

Colorações com hematoxilina e eosina (HE) e picrosirius *red* foram realizadas em cortes longitudinais de nervos com e sem esponja. Após a documentação deste material em microscópio de luz acoplado à câmera digital, a quantificação do colágeno no nervo foi realizada utilizando o *software* ImageJ. Posteriormente, calculou-se a média para cada grupo e realizou-se comparação estatística considerando $p < 0,05$.

A análise morfométrica do nervo lesionado (sete animais por grupo) foi realizada em nervos incluídos em resina, utilizando-se cortes transversais de $0,5\mu\text{m}$ do fragmento do nervo imediatamente distal ao local da lesão obtidos em ultramicrótomo. Os cortes foram corados com azul de toluidina e documentados em microscópio Leica modelo DM500 acoplado a uma câmera HD ICC 50 por meio do *software* LEICA LAS EZ (v1.8.1, Leica Microsystems Limited, Suíça). As imagens foram analisadas no *software* ImageJ. Os diâmetros das fibras mielinizadas, os diâmetros dos axônios mielinizados, a espessura da bainha de mielina e a razão $g^{14,15}$ foram medidos em micrômetros. Os diâmetros foram calculados a partir do perímetro (P) aplicando a fórmula $D = P/\pi$. A espessura da mielina foi calculada pela diferença entre os diâmetros da fibra e do axônio dividido por dois. Além disso, os números de fibras mielinizadas e fibras

degeneradas foram contados. Posteriormente, calculou-se a média para cada grupo e realizou-se comparação estatística considerando $p < 0,05$.

Procedimentos *in vitro*

Todos os experimentos envolvidos com procedimentos *in vitro* foram realizados de acordo com o Comitê de ética local (CEUA/Protocolo UFU 060/13). Três camundongos *Swiss* machos adultos (sob anestesia) foram utilizados para o implante subcutâneo de discos de esponja de poliuretano (diâmetro 1cm X espessura 3mm). Após a implantação, um animal foi deixado com a esponja por 1 dia, outro por 4 dias e outro por 10 dias. Após esses períodos, as esponjas foram extraídas e espremidas para remover o máximo de exsudato possível. Os exsudatos foram analisados e mantidos em freezer até o uso para tratamento em culturas de CS.

O conteúdo de neutrófilos nos exsudatos foi medido pelo ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO) adaptada de Araujo *et al.*¹⁶ e Cassini-Vieira *et al.*¹⁷. Os exsudatos removidos foram ressuspensos em tampão NaPO_4 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma-Aldrich), seguido por três ciclos de congelamento instantâneo em nitrogênio líquido. A atividade de MPO foi realizada nas amostras de sobrenadante medindo a absorbância a 450nm utilizando tetrametilbenzidina 1,6mM (Sigma-Aldrich) e H_2O_2 0,3mM (Sigma-Aldrich). A reação foi parada adicionando 50ml de

H₂SO₄ 4M. Os resultados foram expressos como OD/g de tecido úmido.

A atividade da N-acetil-b-D-glicosaminidase (NAG) foi quantificada pela medida dos níveis da enzima lisossomal em macrófagos ativados, adaptada de Cassini-Vieira *et al.*¹⁷. Os exsudatos foram incubados por 30min com p-nitrofenil-N-acetil-beta-D-glucosaminida 2,24mM (Sigma-Aldrich) preparado em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M, Na₂HPO₄ 0,1 M; pH 4,5) (Proporção 1:1). Parou-se a reação adicionando 100ml de tampão glicina a 266mM, pH 10,6 e determinou-se a absorbância em 400nm. Os resultados foram expressos como nmol/mg.

As culturas de CS foram preparadas de acordo com os métodos de Brockes *et al.*¹⁸ e Assouline *et al.*¹⁹. Os nervos ciáticos de filhotes *Swiss* (2 dias) foram decapitados e seus nervos ciáticos foram removidos e dissecados do epineuro. Os segmentos nervosos foram incubados em colagenase a 0,05% (Sigma-Aldrich) por 30min a 37°C e incubados em 0,15% de tripsina (Sigma-Aldrich) por 20min. Após a incubação, as enzimas foram inativadas pela adição de soro bovino fetal (SFB; Sigma-Aldrich) e 0,01% de DNase (Invitrogen). A mistura foi centrifugada em albumina de soro bovino a 3% (BSA; Sigma-Aldrich) a 1300 RPM durante 10 min e ressuspensa em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen) com 10% de SFB. Uma quantidade de 10⁴ células/poço foi semeada em placa de cultura de 24 poços (Corning/Costar Corporation, MA, EUA) e o tratamento com diferentes exsudatos (1 dia,

4 dias e 10 dias; 10% de exsudatos em DMEM 10% SFB) foi iniciado após 24h. As culturas foram mantidas a uma temperatura de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48h e os tratamentos foram realizados em triplicata.

Após, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10min (Reagen, Brasil) e lavadas em PBS. As culturas foram incubadas durante 45 min com 1% de BSA em PBS contendo 0,25% de Triton-X. A pureza das culturas foi avaliada com o marcador S100β (dados não apresentados) e o anticorpo coelho anti-NGFRp75 (1:400, Sigma-Aldrich) foi utilizado para analisar a presença ou ausência do CS com fenótipo reparativo. Em sequência, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor (1:500, Jackson Laboratories) durante 45 min em temperatura ambiente. Após, as culturas foram lavadas e guardadas com glicerol e DAPI para marcação dos núcleos. As culturas foram observadas sob um microscópio equipado para aquisição de fluorescência. Três áreas aleatórias de cada poço (três poços/grupo) foram documentadas para análise quantitativa no *software* ImageJ para densidade de pixels e contagem de células. O estudo estatístico foi realizado considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Redução da recuperação funcional e menor expressão de NGFRp75 pelas CS em nervo envolto em esponja/migração de CS para a esponja

O Índice Funcional do Ciático (SFI) avalia a recuperação do nervo pela marcha. As medidas são feitas nas pegadas dos animais e é feita uma comparação entre a pegada normal e a denervada e, assim, obtém-se um valor relacionado à função do nervo ciático. A Figura 1 apresenta em A as pegadas adquiridas até o 14º dia pós-cirúrgico. O gráfico em B mostra a evolução do SFI, começando antes da cirurgia e após a recuperação dos animais que ocorreram por volta do 21º dia após a axotomia. Observou-se que os animais implantados com esponja apresentaram pior recuperação em uma fase mais tardia, entre 12 e 21, dias após a axotomia.

Na Figura 2 a expressão da proteína S100beta presente nas CS foi semelhante nos dois grupos, no entanto, a expressão dessa proteína foi verificada dentro da esponja ao redor do nervo lesionado, indicando migração dessas células para o implante. A imunocoloração para o receptor NGFRp75, que está presente em CS com fenótipo pró-regenerativo, foi menos expressa no grupo esponja (Figura 2B e E). Além disso, os neurofilamentos foram marcados para a avaliação qualitativa de axônios em crescimento. Observando as imagens na figura 2C e F é possível notar uma maior presença de pontos de desconexão (*) entre as fibras nervosas, caracterizando o processo degenerativo.

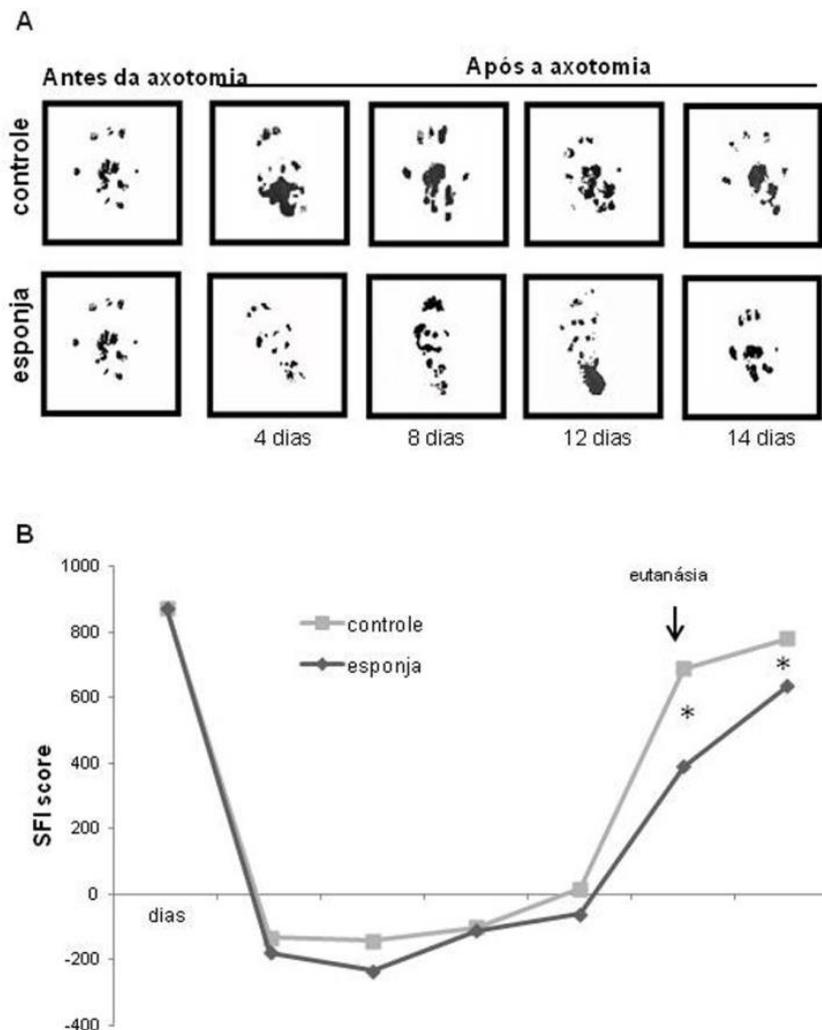


Figura 1. Índice funcional ciático (SFI). A- Pegadas de grupos de controle e esponja. B- Gráfico mostrou evolução do SFI durante 21 dias após a axotomia. A linha cinza representa o grupo de esponja e a linha preta representa o grupo de controle. Observe a evolução inferior do SFI para o grupo esponja. O asterisco (*) indica os pontos em que os grupos apresentaram diferença estatística entre os valores do SFI (Anova unidirecional com pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$). Seta indica o ponto em que a eutanásia foi realizada para extração de tecido para outros experimentos.

Maior deposição de colágeno e sinais de aparente atraso da DW em nervos envoltos por esponja

A área seccional do nervo de ambos os grupos foi similar ($\sim 9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$); entretanto, os nervos envoltos com esponja apresentavam um número inferior de fibras nervosas, especialmente fibras com características de

degeneração (Figura 3D, E e F). Em relação ao conteúdo de colágeno I e III, notamos que o grupo esponja também apresentou diferença significativa, com maior expressão de colágeno (Figura 3G, H e I).

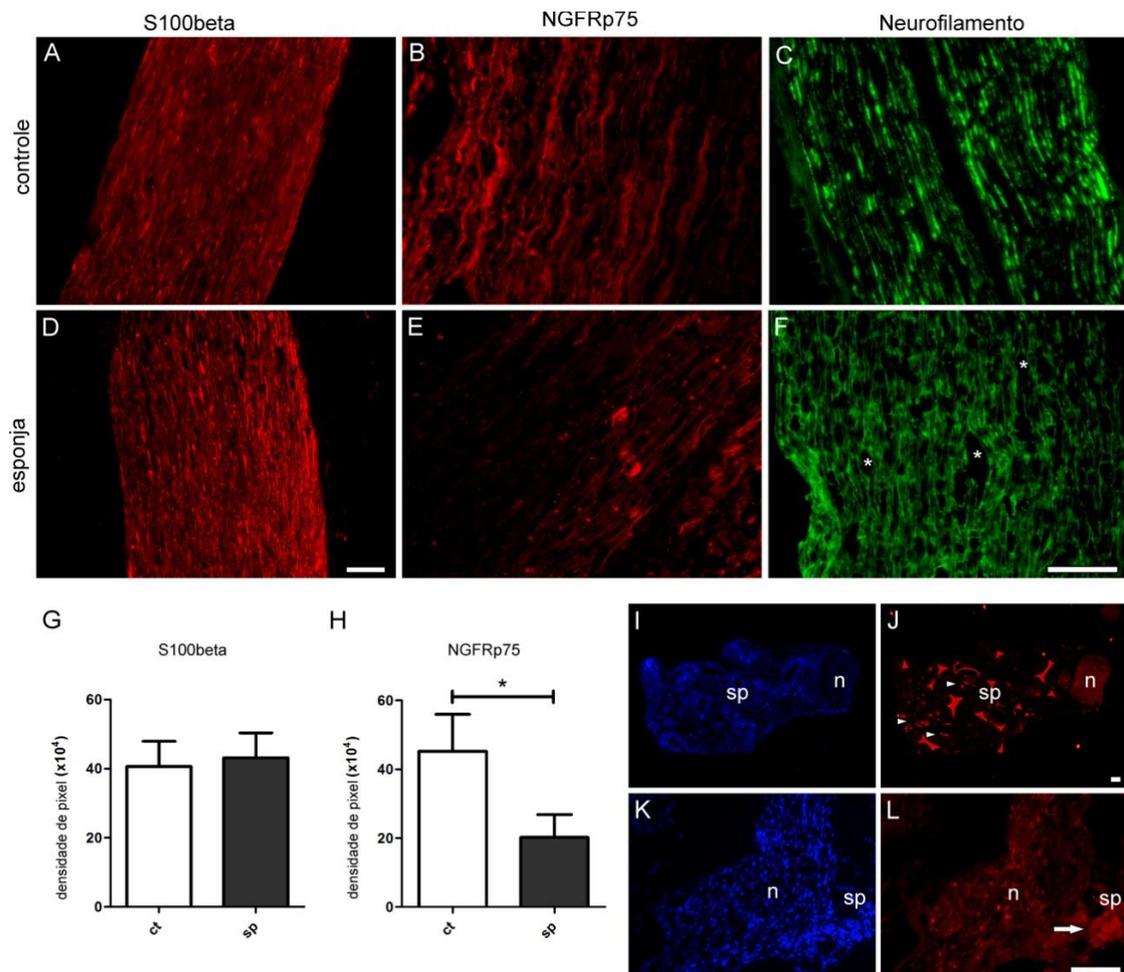


Figura 2: Imunofluorescência em seções longitudinais do nervo ciático após axotomia (A-F) e segmentos nervosos envolvidos pela esponja (I-L). A-C representa figuras do grupo de controle e D-F representa figuras do grupo de esponjas. A coloração de S100beta mostrou expressão semelhante para ambos os grupos, no entanto, a menor expressão de NGFRp75 foi detectada para o grupo esponja, indicando uma redução do reparo de células de Schwann. O arranjo do citoesqueleto axonal mostrado pelo neurofilamento revela vários pontos de desconexão (*) para o grupo esponja. Os gráficos em G e H mostram a quantificação da densidade de pixels para S100beta e NGFRp75 (Anova unidirecional com pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$). Cortes transversais (I-J) e longitudinais (K-L) de esponja (sp) envolvendo o nervo (n): DAPI mostra os núcleos e S100beta mostrou células Shwann (ponta de seta e seta) dentro da esponja. Escala = 100µm.

O tom amarelado, mais intenso no nervo do grupo esponja, indica sobreposição de colágeno I (vermelho) e III (verde).

As Figuras 3J e F mostraram as análises morfométricas: o tamanho do diâmetro da fibra foi semelhante nos dois grupos, uma pequena diferença entre o predomínio do diâmetro da fibra no grupo esponja que mostra mais fibras entre 4-5 μ m comparado ao grupo controle que mostra diâmetros entre 3-4 μ m. Este dado sugere uma bainha de mielina mais espessa para o grupo esponja, o que foi confirmado pelo gráfico de espessura da mielina (grupo controle=0,50-0,75 μ m, grupo esponja=0,75-1,0 μ m).

A razão entre o diâmetro do axônio mielínico e da fibra mielínica (razão g) aponta se a espessura da mielina é adequada para o tamanho do axônio. Este valor será sempre menor que 1,0 (em torno de 0,6) e os axônios remielinizados terão valores próximos a 1,0 (indicando bainha de mielina mais fina)²⁰. O gráfico da razão g do grupo esponja apresentou poucas fibras próximas ao valor 1,0 (em relação ao controle) e algumas fibras com razão g menor que 0,5. Nesse caso, o menor número de fibras com mielina de espessura reduzida pode indicar duas coisas: o processo de remielinização acelerada ou a mielina danificada ainda não foi degradada.

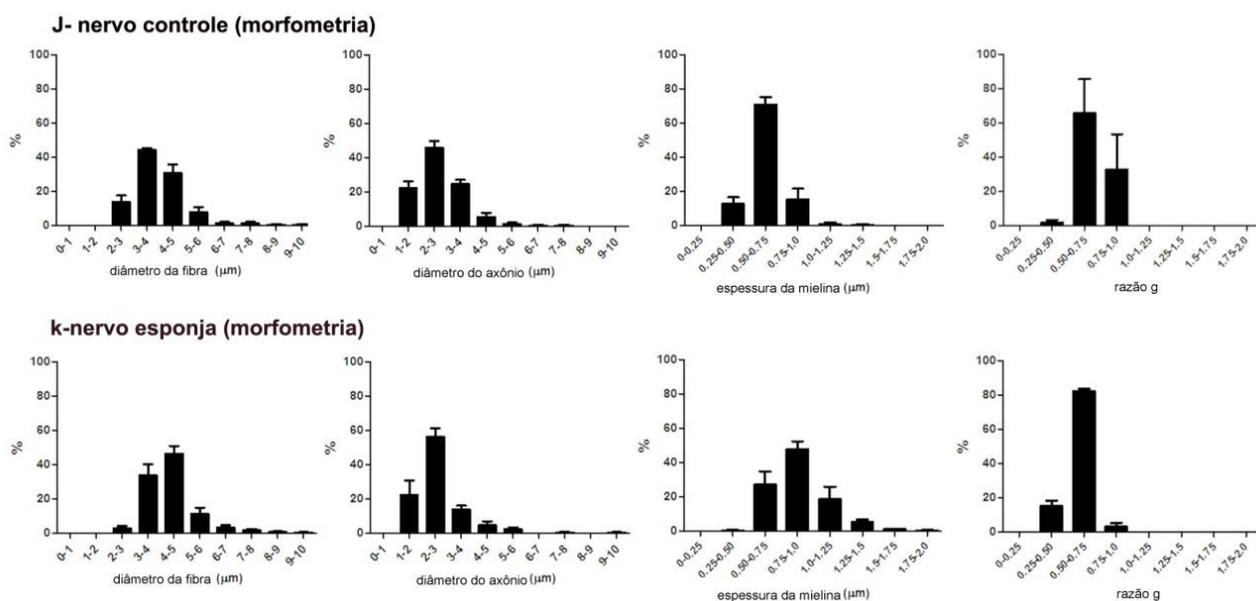
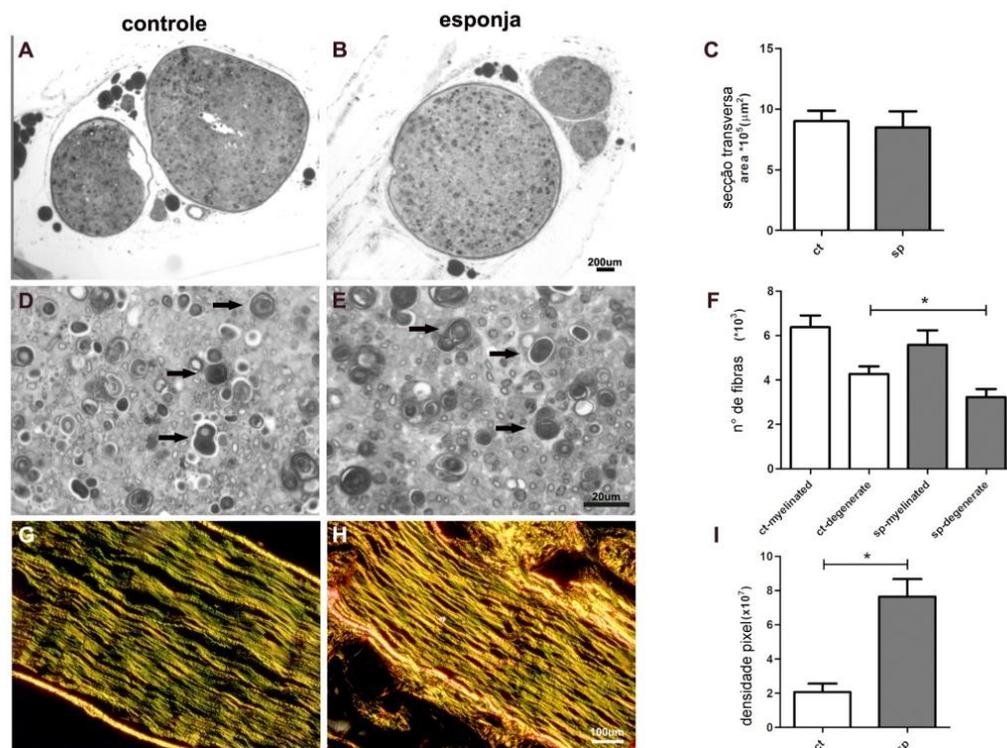


Figura 3: Morfologia e morfometria dos nervos envoltórios controle e esponja. A-C apresentou área transversal total para ambos os grupos. D-F mostra contagem de fibras axotomizadas e degeneradas. Observe o número reduzido de fibras degeneradas para o grupo esponja (teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$). Coloração em picosirius G-I vermelha para os tipos de colágeno I e III. O grupo de esponjas mostrou um aumento de importação de expressão de colágeno em comparação ao controle (Anova one way com o pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$). J e K descrevem a morfometria para o grupo controle e esponja, respectivamente. Observe a maior espessura da mielina para o grupo esponja, juntamente com uma quantidade significativa de fibras com baixa razão g (0,25-0,50), indicando algum prejuízo no processo de remielinização.

Redução de macrófagos e linfócitos T em nervo envolto por esponja

A Figura 4 (A-C) mostra a análise das células imunes no nervo e na esponja. A coloração de HE mostrou grande infiltrado inflamatório nos nervos e dentro da esponja (*).

A imunomarcagem identificou macrófagos (Iba-1), neutrófilos (Anca), linfócitos T (CD3 +) e linfócitos B (CD19 +) em segmentos longitudinais do nervo e esponja após 14 dias de axotomia (Figura 4D-O).

Comparando os nervos de ambos os grupos, notamos principalmente a redução especialmente de macrófagos e linfócitos T no grupo esponja e, em contraste, a alta densidade dessas células no tecido inflamatório no interior da esponja (*).

Os exsudatos extraídos da esponja influenciam a expressão de NGFRp75 por CS *in vitro*

As enzimas NAG (n-acetilglucosaminidase) e MPO (mieloperoxidase) estão associadas à resposta inflamatória mediada por macrófagos e neutrófilos, respectivamente. A NAG é uma enzima produzida predominantemente por macrófagos, e sua atividade pode ser utilizada como meio indireto de medida de macrófagos teciduais²¹. A detecção de MPO também tem sido utilizada como marcador de infiltração neutrofílica²².

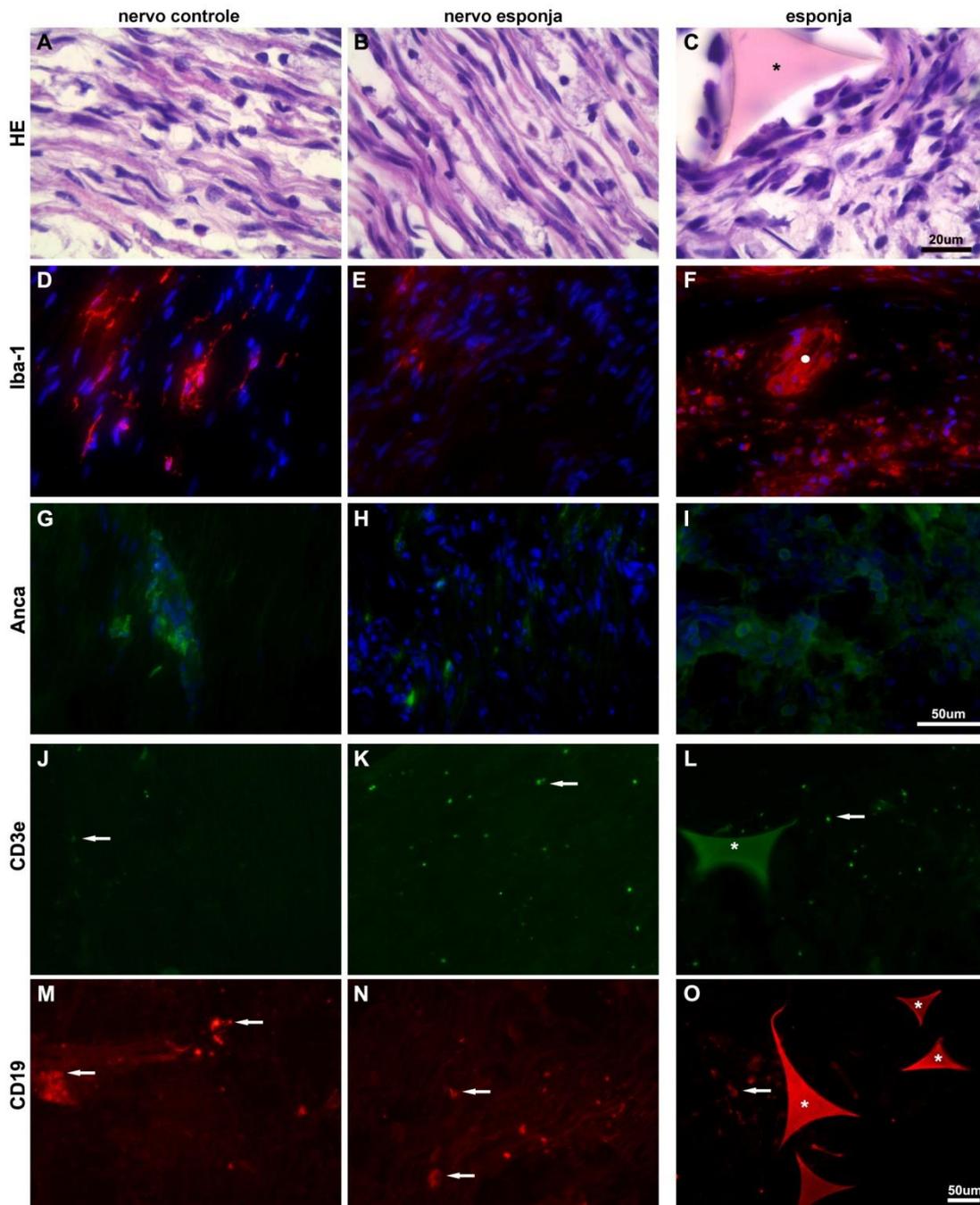


Figura 4: Marcação de células inflamatórias em seções longitudinais de grupos controle e esponja. Grupo de controle (primeira coluna), nervo envolvido em esponja (segunda coluna) e esponja (terceira coluna). Coloração A-C HE mostrando infiltrado inflamatório e células de Schwann. D-O Imunofluorescência para macrófagos (IBA-1), neutrófilos (Anca), linfócito T (CD3, seta) e linfócito B (CD19, seta). Essas marcações indicaram que os nervos envolvidos em esponja tinham menos macrófagos e linfócitos T em comparação com o controle. Em contraste, um número significativo de células inflamatórias, especialmente macrófagos, foi observado dentro da esponja (*). Em F destaca-se uma célula gigante que é uma massa formada pela união de macrófagos (°).

Ao analisar as enzimas mencionadas nos exsudatos extraídos das esponjas (Figura 5 A e B), notamos um aumento progressivo da população de neutrófilos enquanto os macrófagos pareceram permanecer constantes em 1, 4 ou 10 dias de implantação subcutânea. Observamos uma ligeira diminuição da NAG nos exsudato de 4 dias.

Curiosamente, a imunofluorescência para NGFRp75 também mostra uma pequena diminuição em sua expressão por CS tratadas com exsudato de 4 dias (Figura 5 F e I).

O tratamento com exsudado parece influenciar a distribuição das células *in vitro*.

As células tendem a aproximar-se umas das outras enquanto as células controle (não tratadas) permaneceram dispersas na superfície da placa de cultura. Foi também observado um aumento na expressão de NGFRp75 com os tratamentos (Figura 5).

DISCUSSÃO

Após uma lesão do tipo axonotmese ou axotomia, geralmente os axônios periféricos lesionados regeneram-se espontaneamente, e vários fatores contribuem para essa capacidade regenerativa. Após a lesão do nervo periférico, os axônios distais degeneram enquanto as células de Schwann (CS) desdiferenciadas e os macrófagos removem os restos via fagocitose.

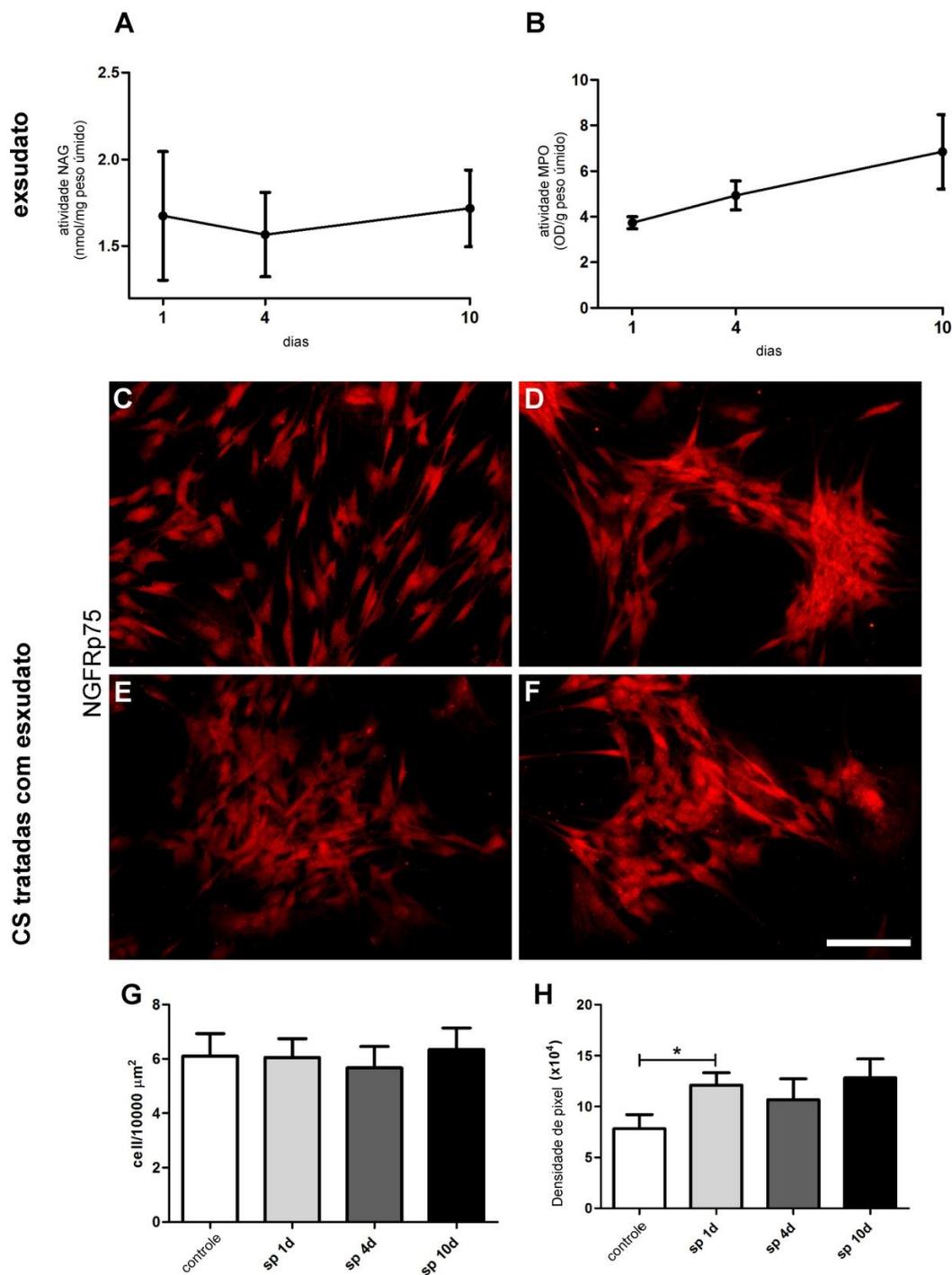


Figura 5. Tratamento in vitro de células de Schwann com exsudatos extraídos de esponjas que foram mantidas no subcutâneo durante 1, 4 ou 10 dias. Os gráficos A-B mostram a atividade da N-acetil-b-D-glicosaminidase (NAG) e da mieloperoxidase (MPO), que são medidas indiretas da população de macrófagos e neutrófilos nos exsudatos. C-F mostra coloração de p75NGFR para controle (sem tratamento), exsuda 1 dia, exsuda 4 dias e exsuda tratamentos de 10 dias. Note que o tratamento com exsudatos resulta na agregação das células de Schwann. A intensidade da marcação com p75NGFR foi menos intensa com o tratamento com exsudatos de 4 dias (H, teste U de Mann Whitney, $p < 0,05$). Isso pode indicar um menor número de células de Schwann de reparo na cultura.

A desdiferenciação refere-se ao estado em que os CS reverterem para um estado imaturo (CS de reparo) para proliferar e auxiliar na regeneração²⁻⁵.

Nesse contexto, um grande número de células imunes, incluindo neutrófilos, macrófagos e células T, são recrutadas e contribuem com as respostas pós-lesão nervosa⁶⁻⁸. Tendo em vista a importância dessas células para os processos de degeneração e regeneração axonal, foi utilizado um modelo de inflamação constituído por um implante de esponja de poliuretano ao redor do nervo axotomizado. Observamos que estes implantes conduziram a um maior prejuízo da recuperação funcional e estrutural do nervo, com redução de macrófagos e de CS com fenótipo regenerativo no nervo axotomizado.

Esses resultados reafirmam a importância da interação e da presença de macrófagos e das CS para o sucesso do processo de regeneração após a lesão nervosa²³⁻²⁴.

O nervo envolto em esponja após 14 dias mostrou vários pontos de desconexão entre as fibras nervosas e a expressão menor de NGFRp75, indicando presença reduzida de CS de reparo em relação ao controle (Figura 2). O receptor p75 para NGF, um receptor característico de CS com fenótipo regenerativo, geralmente aumenta sua expressão após lesão²⁵. Esses dados estão de acordo com o IFC que avaliou a recuperação funcional do nervo em animais axotomizados. O grupo esponja apresentou pior recuperação funcional próximos das últimas análises, ainda

apresentando características de disfunção muscular com adução dos dedos do lado da lesão (Figura 1A).

Também observamos que a colocação da esponja ao redor do nervo axotomizado criou um local de atração para as CS (veja a Figura 2J para S100beta, um marcador usado para CS, dentro da esponja). Essa atração pode ter sido estimulada pela grande concentração de macrófagos dentro da esponja (Figura 4F). Nesse sentido, Zhan *et al.*²⁶ demonstraram que microvesículas derivadas de macrófagos promovem proliferação e migração de CS. Vários estudos demonstraram que os macrófagos não apenas desempenham um papel fundamental na remoção de restos de mielina e modulam as atividades de CS²⁶, mas também são influenciados pelo microambiente lesionado local para promover a regeneração axonal ao liberar um grande número de fatores relacionados à regeneração axonal, incluindo proteínas da matriz extracelular, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas^{6,26,27}. Nossos resultados mostraram, na Figura 4 (D-F), uma redução de macrófagos no nervo axotomizado em comparação ao controle. Nesse sentido, a redução dessas células pode ter prejudicado os processos de DW e regeneração axonal. Além disso, contribuindo para essa ideia, o tratamento com exsudatos em culturas de CS, mostrou uma relação entre o nível de atividade de macrófagos (NAG) e a expressão de NGFRp75. Além disso, as culturas tratadas com exsudatos mostraram agregação de CS, o que corrobora a capacidade

das células imunes ou seus produtos de influenciar a motilidade da CS.

Outras células inflamatórias também foram analisadas no nervo e na esponja, entre elas os neutrófilos muito presentes no interior da esponja, mas no nervo pouco presente e com semelhança para o controle. Em relação aos linfócitos B, um pequeno número de células foi observado no nervo e na esponja. No entanto, os linfócitos T parecem estar mais presentes no nervo envolvido pela esponja, o que pode ter sido estimulado pelo implante e indicar uma pior qualidade do processo regenerativo²⁸. Esses autores sugerem um papel adverso dos linfócitos T e B na recuperação da função motora e na mielinização após lesão do nervo femoral.

As modificações causadas pelo implante de esponja impactaram negativamente a regeneração do ciático e, aparentemente, uma redução das respostas pró-regenerativas das CS também contribuiu para esse dano. Os dados morfométricos e contagem de fibras sugerem alteração na atuação das CS (Figura 3). Os nervos envoltos em esponja mostraram uma quantidade reduzida de fibras degeneradas. Diâmetros de fibras e axônios mielinizados foram semelhantes para ambos os grupos. A espessura da bainha de mielina foi mais espessa para os nervos com esponja e a razão *g* mostrou pior processo de remielinização para o grupo esponja. O conjunto desses dados pode sugerir que o processo de DW foi atrasado, provavelmente por causa de um processo de limpeza dos

debris de fibras lesionadas mais lento, já que houve menos células para essa atividade, o que resultou em menor número de fibras degenerativas.

Além disso, a Figura 3 mostra as seções transversais do nervo de ambos os grupos mostrando áreas semelhantes. No entanto, como vimos acima, menos fibras foram observadas no grupo esponja (Figura 3D-F), nesse caso, outro componente pode estar preenchendo o nervo para que resulte em áreas de secção transversal semelhantes. De fato, a quantidade de colágeno I e III foi substancialmente aumentada nos nervos envoltos em esponja. A presença de coloração amarela nos nervos esponjosos mostrou a presença de colágeno I e III no interior do nervo (Figura 3G-I). Sabendo que no endoneuro temos especialmente colágeno tipo III (verde) e no epineuro principalmente, colágeno tipo I (vermelho)²⁹, o aumento da coloração amarelada pode significar um espessamento tanto do endoneuro quanto do epineuro. A produção de proteínas e colágeno a partir da matriz extracelular do nervo após a axotomia é impulsionada principalmente pela interação entre CS e macrófagos³⁰. Fatores produzidos por macrófagos podem influenciar as CS e os fibroblastos do tecido conjuntivo do nervo estimulando a produção de mais colágeno, uma vez que a população de macrófagos no microambiente ao redor do local da lesão é aumentada. Se essa produção for em excesso pode, até mesmo, levar a cicatrização epineural que, por sua vez, pode impedir a regeneração axonal²⁹.

CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados confirmam a importância da interação entre CS e células imunes, especialmente os macrófagos. O implante de esponja sequestrou CS do nervo, influenciou a densidade de células inflamatórias locais e aumentou a deposição de colágeno no nervo. E como consequência desses achados, sugere-se ter havido comprometimento da DW e atraso da remielinização.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), APQ-00921-14, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001 (Ana Cláudia e Táríka). Agradecemos ao Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo (ICBIM/UFU, MG, Brasil) pela doação de anticorpos marcadores de linfócitos para os procedimentos deste estudo. Ainda, nossos agradecimentos ao REBIR-UFU.

REFERÊNCIAS

- 1.Waller A. Experiments on the section of glosso-pharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alternatives produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1850;140:423-9. <https://doi.org/10.1098/rstl.1850.0021>
- 2.Koeppen AH. Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Sci* 2004;220:115-7. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.03.008>

3. Benowitz LI, Popovich PG. Inflammation and axon regeneration. *Curr Opin Neurol* 2011;24:577-83.
<https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32834c208d>
4. Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol* 2016;594:3521-31.
<https://doi.org/10.1113/JP270874>
5. Wong KM, Babetto E, Beirowski B. Axon degeneration: make the Schwann cell great again. *Neural Regen Res* 2017;12:518-24.
<https://doi.org/10.1113/JP270874>
6. Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol* 2015;130:605-18.
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1482-4>
7. Perry VH, Tsao JW, Fearn, Brown MC. Radiation-induced reductions in macrophage recruitment have only slight effects on myelin degeneration in sectioned peripheral nerves of mice. *Eur J Neurosci* 1995;7:271-80.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01063.x>
8. Francesco-Lisowitz A, Lindborg JA, Niemi JP, Zigmond RE. The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. *Neurosci* 2015;302:174-203.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.027>
9. Grindlay JH, Waugh JM. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. *Arch Surg* 1951;63:288-97.
<https://doi.org/10.1001/archsurg.1951.01250040294003>
10. Andrade SP, Fan TPD, Lewis GP. Quantitative *in vivo* studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br J Exp Path* 1987;68:755-66.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2013085/>
11. Araújo FA, Rocha MA, Capettini LS, Campos PP, Ferreira MA, Lemos VS, *et al.* 3-Hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor (fluvastatin) decreases inflammatory angiogenesis in mice. *APMIS* 2013;121:422-30. <https://doi.org/10.1111/apm.12031>
12. Zanon RG, Cartarozzi LP, Victório CS, Moraes JC, Morari J, Velloso LA, *et al.* Interferon (IFN) beta treatment induces major histocompatibility complex (MHC) class I expression in the spinal cord and enhances axonal growth and motor function recovery following sciatic nerve crush in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010;36:515-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01095.x>
13. Inserra MM, Bloch DA, Terris DJ. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery* 1998;18:119-24. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2752\(1998\)18:2<119::aid-micr10>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2752(1998)18:2<119::aid-micr10>3.0.co;2-0)
14. Smith RS, Koles ZJ. Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *Am J Physiol* 1970;219:1256-8.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1970.219.5.1256>
15. Mayhew TM, Sharma AK. Sampling schemes for estimating nerve fiber size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J Anat*

1984;139:59-66.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1164446/>

16.Araujo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-alpha and TGF-beta1. *Biomed Pharmacother* 2010;64:29-34. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.03.003>

17.Cassini-Vieira P, Deconte SR, Tomiosso TC, Campos PP, Montenegro CF, Selistre-de-Araújo HS, *et al.* DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. *Toxicol* 2014;92:81-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2014.10.007>

18.Brockes JP, Fields KL, Raff MC. Studies on culture rat Schwann cell. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 1979;165:105-28. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90048-9)

19.Assouline JG, Bosch EP, Lim R. Purification of rat Schwann cells from cultures of peripheral nerve: an immunoselective method using surfaces coated with antiimmunoglobulin antibodies. *Brain Res* 1983;277:389-92. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90953-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90953-8)

20.Chomiak T, Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One* 2009;4:e7754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007754>

21.Lamaita, RM, Pontes A, Belo AV, Caetano JP, Andrade SP, Cândido EB, *et al.* Evaluation of N-acetilglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. *J Obstet Gynaecol Res* 2012;38:810-6. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2011.01805.x>

22.McConnico RS, Weinstock D, Poston ME, Roberts MC. Myeloperoxidase activity of the large intestine in an equine model of acute colitis. *Am J Vet Res* 1999;60:807-13.

23.Bombeiro AL, Santini JC, Thomé R, Ferreira ER, Nunes SL, Moreira BM, *et al.* Enhanced immune response in immunodeficient mice improves peripheral nerve regeneration following axotomy. *Front Cell Neurosci* 2016;10:151. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00151>

24.Gaudet AD, Gopovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflamm* 2011;8:110. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-110>

25.Meeker RB, Williams KS. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res* 2015;10:721-5. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.156967>

26.Zhan C, Ma C, Yuan H, Cao B, Zhu J. Macrophage-derived microvesicles promote proliferation and migration of Schwann cell on peripheral nerve repair. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;468:343-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.097>

27.Martini R, Fischer S, Lopez-Vales R, David S. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* 2008;56:1566-77. <https://doi.org/10.1002/glia.20766>

- 28.Mehanna A, Szpotowicz E, Schachner M, Jakovcevski I. Improved regeneration after femoral nerve injury in mice lacking functional T- and B-lymphocytes. *Exp Neurol* 2014;261:147–55. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.012>
- 29.Koopmans G, Hasse B, Sinis N. The Role of Collagen in Peripheral Nerve Repair. *In: International Review of Neurobiology*. Geuna S, Tos P, Battiston B (Ed.). San Diego: Academic Press, 2009, p.363-79.
- 30.Singh N, Birdi TJ, Chandrashekar S, Antia NH. Schwann cell extracellular matrix protein production is modulated by *Mycobacterium leprae* and macrophage secretory products. *J Neurol Sci* 1997;151;13-22. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(97\)00105-6](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(97)00105-6)