



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO FRAGA FILHO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

O USO DA TERAPIA GENÉTICA NA MELHORA DA REGENERAÇÃO DO  
NERVO ISQUIÁTICO EM CAMUNDONGOS APÓS ESMAGAMENTO

**Viviane de Oliveira Souza**

**2023**



# **O USO DA TERAPIA GENÉTICA NA MELHORA DA REGENERAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO EM CAMUNDONGOS APÓS ESMAGAMENTO**

**Viviane de Oliveira Souza**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadoras: Ana Maria Blanco Martinez e Katia Carneiro de Paula

Rio de Janeiro

2023

## RESUMO

As lesões de nervos periféricos são um grande problema de saúde e podem ser resultado de traumas, incluindo acidentes automobilísticos, atos de violência e outros, deixando os indivíduos com incapacidades temporárias ou permanentes que interferem nas tarefas da vida diária desses pacientes. Portanto, é importante a busca por novos tratamentos que possam melhorar os resultados funcionais e morfológicos. Nesse sentido, a terapia epigenética tem recebido grande atenção devido aos seus efeitos antiinflamatórios e propriedades pró-regenerativas. O ácido valpróico é um inibidor da histona desacetilase que demonstrou efeitos neuroprotetores e antiapoptóticos em condições degenerativas e pode, portanto, ser usado para tratar lesões nervosas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial regenerativo do inibidor de HDAC (iHDAC) ácido valpróico (VPA) após esmagamento do nervo isquiático de camundongos. Foram utilizados camundongos C57/Black6 machos que tiveram os nervos esmagados por um minuto com uma pinça Dumont#5 e, no primeiro dia após a cirurgia, o tratamento foi realizado com injeções intraperitoneais diárias de VPA (300 mg/kg) durante 14 dias. O grupo tratado com VPA foi comparado com três grupos controle: sham (o nervo foi apenas exposto), lesão (o nervo foi apenas esmagado) e PBS (o nervo foi lesionado e tratado com PBS assim como o grupo tratado com VPA). O índice funcional isquiático (IFI) e o teste da picada de agulha foram realizados para avaliar as funções motoras e sensitivas, respectivamente. Esses testes demonstraram melhora significativa no grupo tratado com VPA em relação aos outros grupos. O tempo de sobrevivência dos animais foi de três semanas e os nervos dissecados foram processados para obtenção de cortes semifinos e corados com azul de toluidina para microscopia óptica. A análise morfológica dos cortes semifinos mostrou aumento com diferença significativa do número de fibras mielínicas no grupo tratado com VPA quando comparado aos outros grupos. Foi realizada a caracterização da resposta imunológica aguda após o esmagamento do nervo isquiático e tratamento com VPA, por citometria de fluxo, com a coleta de células totais da cavidade peritoneal no quarto dia após o esmagamento para investigar o perfil de resposta imunológica induzido pelo tratamento que demonstrou aumento de células CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) com diferença estatística significativa. Com base nesses resultados, podemos concluir que o VPA pode ser uma opção terapêutica eficaz para melhorar a dor e o processo de regeneração do nervo isquiático, potencialmente através da alteração da resposta imune aguda.

## ABSTRACT

Peripheral nerve injuries are a major health problem and can be result from trauma, including car accidents, acts of violence, and others, leaving individuals with temporary or permanent disabilities that interfere with the daily tasks of these patients. Therefore, it is important to search for new treatments that can improve functional and morphological outcomes. In this regard, epigenetic therapy has received great attention due to its anti-inflammatory effects and pro-regenerative properties. Valproic acid is a histone deacetylase inhibitor that has demonstrated neuroprotective and anti-apoptotic effects in degenerative conditions and can therefore be used to treat nerve injuries. Thus, the aim of this study was to evaluate the regenerative potential of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) valproic acid (VPA) after crushing the ischiatic nerve in mice. Male C57/Black6 mice were used, and their nerves were crushed for one minute with a Dumont#5 forceps. On the first day after surgery, treatment was performed with daily intraperitoneal injections of VPA (300 mg/kg) for 14 days. The VPA treated group was compared with three control groups: sham (nerve was only exposed), injury (nerve was only crushed), and PBS (nerve was injured and treated with PBS, similar to the VPA treated group). The ischiatic functional index (IFI) and the pinprick test were performed to evaluate motor and sensory functions, respectively. These tests showed a significant improvement in the VPA treated group compared to the other groups. The animal survival time was three weeks, and the dissected nerves were processed to obtain semithin sections stained with toluidine blue for optical microscopy. Morphological analysis of the semithin sections showed a significant increase in the number of myelinated fibers in the VPA treated group compared to the other groups. The characterization of the acute immune response after crushing the ischiatic nerve and treatment with VPA was performed by flow cytometry, with the collection of total cells from the peritoneal cavity on the fourth day after crushing to investigate the profile of immune response induced by the treatment, which showed a statistically significant increase in CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup> cells (neutrophils). Based on these results, we can conclude that VPA may be an effective therapeutic option to improve pain and the process of sciatic nerve regeneration, potentially through the alteration of the acute immune response.

## LISTA DE ABREVIATURAS:

**AKT** – também conhecida como PKB de Proteína Kinase B

**BDNF** – do inglês “*brain derived neurotrophic fator*”

**Ca<sup>2+</sup>** - íon cálcio (cátion divalente)

**CAM** – do inglês “*cell adhesion molecules*”

**COX-2** – do inglês “*Cyclooxygenase-2*”

**DAMPs** – do inglês “*damage associated molecular patterns*”

**DNA** – do inglês “*deoxyribonucleic acid*”

**GABA** – do inglês “*gamma aminobutryc acid*”

**GAD** – do inglês “*glutamate decarboxylase*”

**G-CSF** – do inglês “*granulocyte colony stimulating factor*”

**GSK-3β** – do inglês “*glycogen synthase kinase 3 beta*”

**FDA** – do inglês “*Food and Drug Administration*”

**HAT** – do inglês “*histone acetyltransferase*”

**HDAC** – do inglês “*histone deacetylases*”

**IFI** – do inglês “*ischiatric functional index*”

**IL-6** – do inglês “*interleukin 6*”

**IL-1β** - do inglês “*interleukin 1 beta*”

**iNOS** - do inglês “*inducible nitric oxide synthase*”

**MEC** - matriz extracelular

**MPT** - modificações pós-traducionais

**NAD** - do inglês “*nicotinamide adenine dinucleotide*”

**NGCs** – do inglês “*nerve growth cones*”

**NG-CAM** - do inglês “*neural cell adhesion molecule*”

**NGF**- do inglês “*nerve growth fator*”

**NGFR** - do inglês “*nerve growth fator receptor*”

**pAKT**- do inglês “*phosphorylated protein kinase b*”

**PAMPs** - do inglês “*pathogen associated molecular patterns*”

**PBS** - do inglês “*phosphate buffered saline*”

**PNI** - do inglês “*peripheral nerve injury*”

**pGSK-3 $\beta$**  - do inglês “*phosphorylated glycogen synthase kinase 3 beta*”

**SNC** – sistema nervoso central

**SNP** – sistema nervoso periférico

**TNF- $\alpha$**  - do inglês “*tumor necrosis factor alpha*”

**TGF- $\beta$**  - do inglês “*transforming growth fator beta*”

**VEGF** - do inglês “*vascular endotelial growth fator*”

**VPA** - do inglês “*valproic acid*”

## LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Esquema da estrutura de um neurônio.....	14
Figura 2. Ilustração de um nervo periférico com sua organização estrutural.....	15
Figura 3: Curso da degeneração Walleriana.....	18
Figura 4: Reprogramação da célula de Schwann após lesão nervosa periférica...20	
Figura 5: Representação proposta por Waddington de “ <i>Epigenetic landscape</i> ” ...21	
Figura 6: Organização do DNA em um cromossomo em uma célula em divisão..23	
Figura 7: Estrutura do nucleossomo em vários níveis de organização.....	23
Figura 8: A estrutura cristalina de HDACs.....	25
Figura 9: Classificação das Lesões dos Nervos Periféricos.....	32
Figura 10: Autoenxerto e considerações para o desenvolvimento de terapêuticas alternativas.....	33
Figura 11: Exemplo de tubos feitos de colágeno.....	35
Figura 12: Fórmula estrutural plana do ácido valproico.....	38
Figura 13: Inibição da HDAC pelo VPA.....	41
Figura 14: Imagem do procedimento cirúrgico.....	45
Figura 15: Imagem ilustrativa do IFI.....	47
Figura 16: Imagem ilustrativa do teste pinprick.....	48
Figura 17: Imagem ilustrativa do segmento do nervo utilizado para as análises morfológicas.....	48
Figura 18: Imagem ilustrativa dos 5 campos fotografados para a análise da razão-G.....	50
Figura 19: Representação esquemática da razão-G.....	51
Figura 20: Análise funcional pelo teste pinprick.....	53

Figura 21 - Análise funcional pelo Índice de Função do Isquiático.....	54
Figura 22: Cortes semifinos da porção tibial, distal à lesão.....	55
Figura 23: Análise qualitativa do número de fibras mielínicas nos cortes transversais semifinos.....	56
Figura 24: Análise quantitativa do número de vasos sanguíneos.....	56
Figura 25: Análises morfológicas quantitativas da área do axônio, área da fibra, área da mielina e G-Ratio.....	57
Figura 26: Caracterização da resposta imune aguda por citometria de fluxo.....	58



**LISTA DE TABELAS:**

Tabela 1: Grupos experimentais.....44

## **LISTA DE QUADROS:**

Quadro 1: Inibidores de HDACs de Classes I, II e III.....	26
---	----

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 SISTEMA NERVOSO .....	12
1.2 NERVOS PERIFÉRICOS .....	12
1.3 DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO NERVOSA .....	16
1.4 EPIGENÉTICA: HISTONAS DESACETILASES (HDACS).....	21
1.5 INIBIDORES DE HDACS (HDACI) .....	25
1.6 REPARO TECIDUAL E INFLAMAÇÃO .....	27
1.7 LESÕES TRAUMÁTICAS DO SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO	30
1.8 ESTRATÉGIAS DE REPARO .....	32
1.9 TERAPIA EPIGENÉTICA .....	35
1.10 TERAPIA FARMACOLÓGICA .....	36
1.10.1 Ácido valproico .....	37
1.10.1.1 Farmacocinética .....	38
1.10.1.2 Mecanismos de ação (farmacodinâmica) .....	39
1.10.1.3 Ácido valproico na regeneração do sistema nervoso periférico .....	40
1.10.1.4 Ácido valproico e histonas desacetilases .....	41
1.11 JUSTIFICATIVA.....	42
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
3.1 ANIMAIS .....	44
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	44
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	45
3.3 ADMINISTRAÇÃO DO TRATAMENTO .....	45
3.4 TESTES FUNCIONAIS .....	46
3.4.1 Índice de função do isquiático (IFI).....	46
3.4.2 Teste da picada do alfinete (Pinprick test) .....	47

3.5	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA.....	48
3.6	PROCESSAMENTO DO NERVO PARA CORTES SEMIFINOS .....	49
3.7	ANÁLISES MORFOMÉTRICAS .....	50
3.8	CITOMETRIA DE FLUXO.....	51
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
4.1	ANÁLISES FUNCIONAIS .....	53
4.1.1	Pinprick .....	53
4.1.2	Índice de Função do Isquiático (IFI).....	54
4.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO NERVO ISQUIÁTICO .....	54
4.3	CITOMETRIA DE FLUXO.....	57
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso apresenta subdivisões especializadas e fortemente ligadas pelo fato de desempenharem uma série de funções. Basicamente, o sistema nervoso está dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O sistema nervoso central é composto pelo encéfalo, que se encontra dentro da caixa craniana e pela medula espinal, que se encontra dentro do canal vertebral. Já o sistema nervoso periférico é constituído pelos nervos, que mesmo fazendo parte do SNP, penetram nas cavidades ósseas para se conectar com o SNC e possibilitar o fluxo de informações aferentes (que são as que chegam a uma determinada estrutura do SNC, conduzidas por fibras aferentes) e eferentes (que são as que deixam determinadas estruturas do SNC, conduzidas por fibras eferentes). Outras estruturas que também fazem parte do sistema nervoso periférico são os gânglios nervosos, que estão distribuídos pelo corpo, que são grupamentos de corpos celulares de neurônios e células da glia, localizados fora do SNC (Martinez *et al.*, 2014).

O tecido nervoso está localizado ao longo de todo o organismo, no qual se interligam e em conjunto, constituem o sistema nervoso. Constituído por células e matriz extracelular, as células são caracterizadas por neurônios e pelas células da glia (neuroglia) e entre essas células está localizada a matriz extracelular. Entre os corpos celulares dos neurônios, estão os prolongamentos de neurônios, axônios e dendritos, o neurópilo, área na qual ocorrem a maioria das sinapses do SNC (Martinez *et al.*, 2014).

## 1.2 NERVOS PERIFÉRICOS

O sistema nervoso periférico (SNP) é considerado uma porção relativamente simples do sistema nervoso quando comparado ao sistema nervoso central. Os nervos do SNP são compostos por fibras sensitivas aferentes, e fibras motoras eferentes que se projetam para o músculo estriado esquelético através das junções neuromusculares.

Localizados no sistema nervoso central, os interneurônios (medula espinal e encéfalo) modulam as informações antes da ativação das fibras eferentes, em resposta à estimulação aferente. Dessa forma, o SNP é considerado o mediador da relação entre o meio externo e o corpo (Catala e Cubis, 2013).

Os nervos são formados por um grande número de axônios, podendo ser envoltos por uma estrutura complexa formada por membranas justapostas, sem citoplasma entre elas, denominada mielina (fibras mielínicas) ou sem mielina (fibras amielínicas). Além disso, os corpos celulares das células nervosas estão localizados no sistema nervoso central (SNC) ou dentro dos gânglios nervosos (Martinez *et al.*, 2014).

Os neurônios (Fig. 1) são as células que, juntamente com as células da glia, formam os gânglios e nervos fora do SNC, no SNP (Martinez *et al.*, 2014). O citoplasma do corpo celular do neurônio (localizado ao redor do núcleo) possui um importante retículo endoplasmático rugoso, refletindo a grande quantidade de síntese proteica necessária para sua sobrevivência. O complexo de Golgi está envolvido no armazenamento de moléculas de sinalização que são utilizadas para liberar e transportar as proteínas. Ele também está envolvido na síntese de neurotransmissores, as moléculas de sinalização que convertem o sinal químico em elétrico na sinapse e participa do transporte da informação elétrica de um neurônio para outro. Para superar a alta demanda de energia dos neurônios, numerosas mitocôndrias são necessárias, particularmente considerando a atividade das bombas de íons e a manutenção do potencial da membrana. Normalmente, os dendritos formam a maior parte da superfície do neurônio. Eles são extensões curtas e ramificadas do corpo celular, ao passo que o axônio é uma única e longa extensão, originando-se do corpo celular. Os axônios em geral, se ramificam em sua extremidade mais distal e projetam para diferentes alvos neuronais, glandulares ou musculares (Catala e Cubis, 2013).

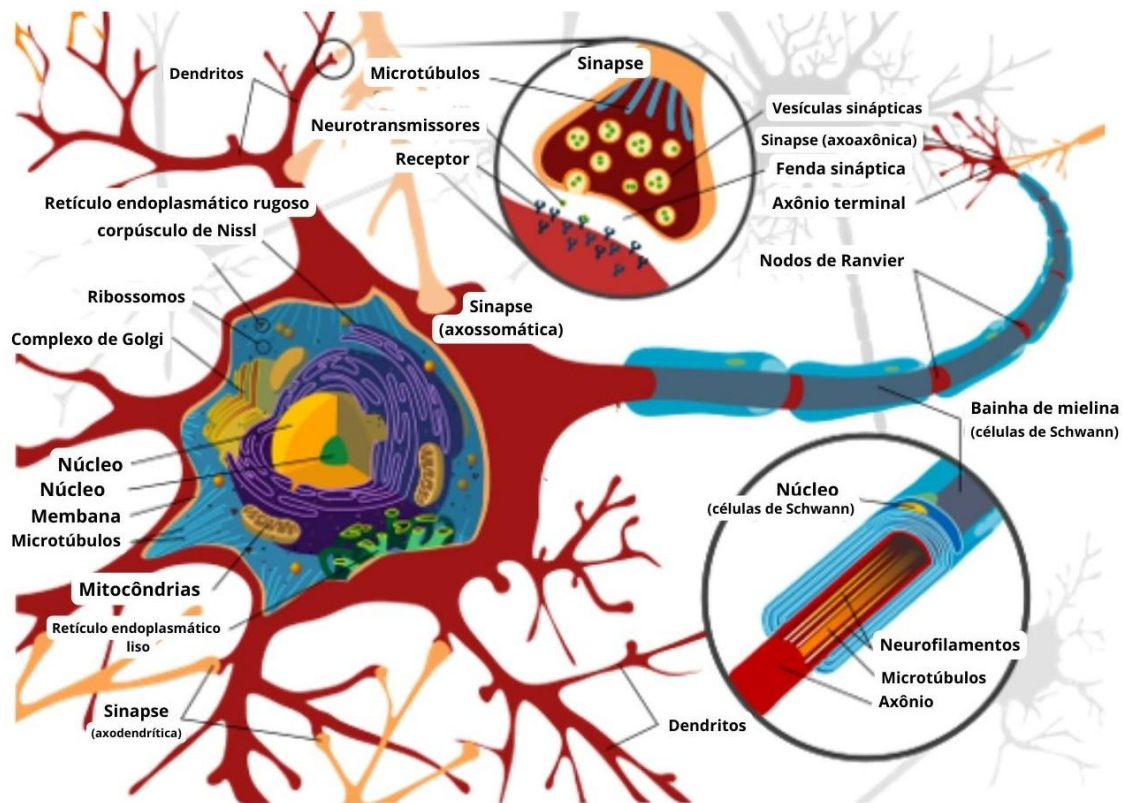


Figura 1: Esquema da estrutura de um neurônio. O corpo celular dos neurônios contém o núcleo, o depósito da informação genética, e origina dois tipos de prolongamentos celulares, o axônio e os dendritos. Muitos axônios são isolados por uma bainha gordurosa de mielina, que é interrompida regularmente em alguns pontos chamados nós de Ranvier. O potencial de ação é iniciado no segmento inicial do axônio, e propaga-se para a sinapse, local no qual os sinais se comunicam de um neurônio a outro e aos órgãos alvo. As ramificações do axônio do neurônio pré-sináptico transmitem sinais para a célula pós-sináptica. Os dendritos basais e apicais junto com o corpo celular são os elementos aferentes do neurônio, recebendo sinais de outro neurônio. Fonte: [LadyofHats](#) - Trabalho próprio. Imagem renomeada de [Image:Complete neuron cell diagram.svg](#).

Compostos por um parênquima (axônio e células de Schwann) e um estroma (um esqueleto, formado de vários elementos conectivos), os nervos periféricos possuem como menor unidade funcional as fibras nervosas, que são classificadas de acordo com a velocidade de condução, função e diâmetro da fibra (Geuna *et al.*, 2009).

As células de Schwann envolvem os axônios periféricos e são consideradas as principais células gliais do SNP. Ao envolver os axônios, essas células podem formar bainha de mielina (fibras mielínicas) ou não (fibras amielínicas); ao formar bainha de mielina, cada célula se ocupa de apenas um internodo de uma fibra nervosa. As células de Schwann são imensamente plásticas, sendo por isso, importantes após lesões de nervos

periféricos. Sua capacidade de proliferação e de liberação de fatores neurotróficos é fundamental para a regeneração dos nervos periféricos (Figura 2) (Martinez *et al.*, 2014).

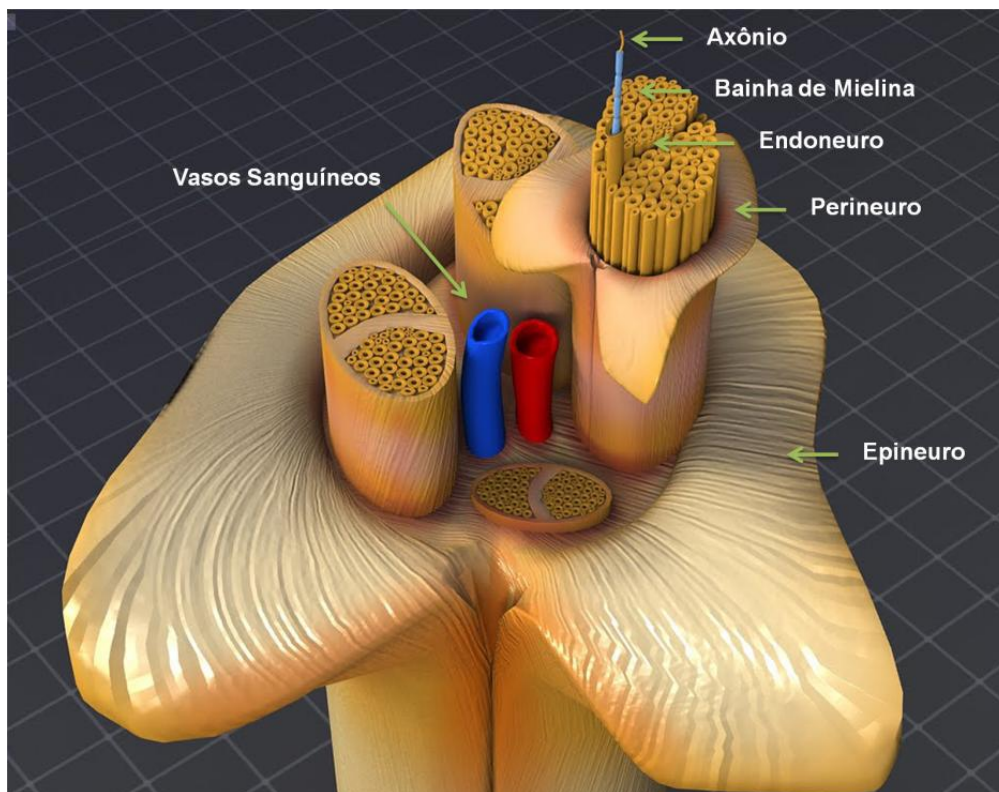


Figura 2. Ilustração de um nervo periférico com sua organização estrutural. Sua camada mais externa, o epineuro envolvendo todo o nervo; o perineuro, a camada intermediária que envolve cada fascículo; e a camada mais interna, o endoneuro envolvendo cada axônio. Reproduzido e adaptado de <http://www.turbosquid.com/FullPreview/Index.cfm/ID/540451?referral=digitallab3d>, (17/06/2023).

Nos nervos calibrosos, as fibras nervosas estão agrupadas em feixes de diferentes espessuras, separados por lâminas de tecido conjuntivo. Em contraste, os nervos mais delgados consistem em um único feixe. Os nervos calibrosos são revestidos externamente por uma faixa de tecido conjuntivo chamada epineuro, que geralmente se conecta ao tecido conjuntivo das estruturas vizinhas. Nervos delgados, normalmente localizados no interior de órgãos, são envolvidos pelo tecido conjuntivo que compõe o estroma do órgão, ou seja, eles não possuem um revestimento próprio. O feixe único ou conjunto de feixes de fibras nervosas de um nervo é envolvido diretamente por uma fina bainha chamada perineuro. Essa bainha é formada por camadas de células alongadas que se unem por junções oclusivas, agindo como uma barreira para a passagem de macromoléculas e também desempenhando um papel importante na defesa contra agentes agressivos (barreira hematonervosa). O epineuro pode se estender para o interior de nervos muito



espessos, separando feixes menores, cada um com seu próprio perineuro. Entre as fibras nervosas individuais, há uma delicada camada de tecido conjuntivo composta principalmente por fibrilas colágenas e fibras reticulares sintetizadas pelas células de Schwann, chamada endoneuro (Junqueira e Carneiro, 2019).

### 1.3 DEGENERACÃO E REGENERACÃO NERVOSA

No momento em que ocorre uma lesão no sistema nervoso, suas fibras podem ser regeneradas a partir daquelas que foram lesionadas, principalmente no SNP. No entanto, aquelas fibras que não foram lesionadas podem gerar fibras colaterais, que se projetam para a área anteriormente ocupada pelas fibras lesionadas, podendo fazer um novo contato sináptico com o alvo, proporcionando melhora funcional, ainda que restrita (Martinez *et al.*, 2014).

Subsequente às lesões nervosas ocorrem perdas, que podem ser parciais ou totais, das funções motoras e sensoriais além das funções autonômicas nos segmentos desnervados, causadas pela interrupção da continuidade dos axônios e da degeneração das fibras nervosas distais à lesão, e pela eventual morte de neurônios (Navarro *et al.*, 2007).

Apesar do potencial regenerativo do sistema nervoso periférico ser muito bom, e a recuperação total da função possa ser observada em animais experimentais, no ser humano na maioria das vezes essa recuperação não ocorre em sua totalidade. O sucesso da regeneração irá depender do tipo e do tamanho da lesão, da distância entre o local da lesão e o órgão-alvo, da idade do indivíduo e da manutenção do órgão-alvo (Martinez *et al.*, 2014).

No momento em que um axônio é seccionado, torna-se anatomicamente dividido em coto distal, que é separado do soma, e um coto proximal que permanece ligado ao corpo celular. O coto distal sofre uma série de alterações degenerativas, denominada degeneração Walleriana. O início dessas alterações ocorre com a degeneração do axônio, seguida da degeneração da bainha de mielina. O determinante do tempo de sobrevivência do coto distal será a distância entre o local da lesão e o corpo celular. Quanto menor for essa distância, ou seja, quanto maior for o coto distal, maior será o tempo de sobrevivência do

mesmo. A desintegração do citoesqueleto do axônio é um dos primeiros eventos degenerativos que ocorre no coto distal. Observa-se o progressivo desaparecimento dos elementos do citoesqueleto axoplasmático, que vão sendo gradativamente substituídos por material granular amorfo. Na maioria das vezes, o axoplasma fica com aspecto aquoso (degeneração aquosa), mas, às vezes, assume aspecto escuro (degeneração escura). Os primeiros elementos a sofrerem dissolução são os microtúbulos, sendo os neurofilamentos os elementos mais resistentes (Burnett e Zager, 2014 e Martinez *et al.*, 2014).

Em aproximadamente 48 a 96 horas após a lesão, ocorre perda axonal e a condução de impulsos nervosos não é mais possível. A desintegração da mielina ocorre um pouco depois da dos axônios, mas é bem avançada em 36 a 48 horas. O processo se inicia em uma área restrita do axoplasma dentro de uma mesma fibra nervosa e vai progressivamente aumentando até que toda a fibra se encontre desprovida de elementos característicos do axoplasma. Ainda não se conhecem completamente os mecanismos que deflagram todo o processo degenerativo e que induzem a dissolução do citoesqueleto, porém existem muitas evidências de que podem ser devido ao aumento do cálcio intra-axonal. O aumento dos níveis de cálcio ativa proteases (calpaínas) presentes normalmente no axoplasma, participando do processo de renovação dos elementos do citoesqueleto. A ativação das calpaínas promove a dissolução do citoesqueleto, o que leva a um colapso axonal. Evidências recentes sugerem que as calpaínas degradam preferencialmente os neurofilamentos, e os microtúbulos são degradados pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Martinez *et al.*, 2014).

Cerca de 5 a 30 minutos após a lesão do nervo, os segmentos axonais proximal e distal ao sítio da lesão, exibem uma degeneração axonal aguda à curta distância, um evento que é mediado principalmente pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e ativação intracelular de calpaína, protease dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 3) (Wang *et al.*, 2012).

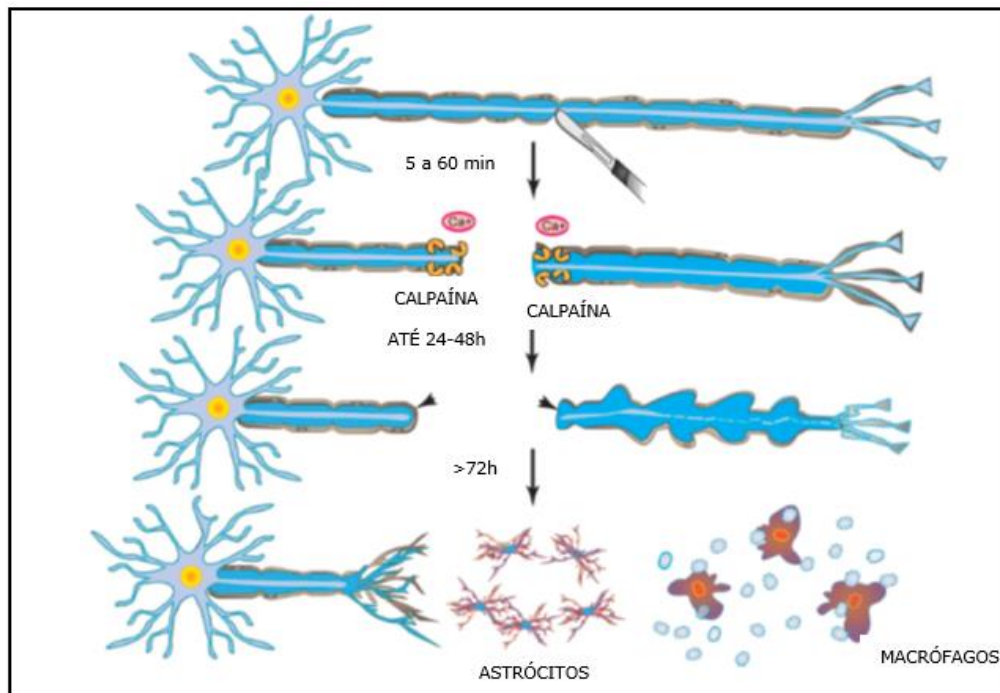


Figura 3: Curso da degeneração Walleriana – dentro de 5 a 30 minutos após a lesão nervosa, os segmentos axonais próximos (à esquerda) e distantes (à direita) do local da lesão sofrem uma degeneração aguda do axônio, que é principalmente mediada pela entrada e ativação extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  da protease intracelular dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  chamada calpaína. Este evento é seguido por uma retração axonal mais lenta e formação de bulbos axonais nos locais da lesão (cabeças de seta). Em 24 a 48 horas após a lesão, há um período de relativa latência, durante o qual o axônio distal continua morfológicamente estável e eletricamente excitável. Passadas mais de 72 horas da lesão, acontece uma rápida fragmentação e ruptura do citoesqueleto ao longo de todo o comprimento do axônio distal. Isso é seguido por um aumento do influxo de macrófagos e proliferação de células de Schwann) para limpar os restos axonais (indicados por círculos azuis) e possivelmente auxiliar nas tentativas regenerativas do axônio proximal (Wang *et al.*, 2012).

Junto às alterações do citoesqueleto, algumas modificações começam a ocorrer nos nodos de Ranvier, cerca de 30h após a lesão. Há o início da retração das alças mielínicas paranodais, levando ao aumento do espaço nodal, deixando exposta uma área do axolema que antes era recoberta por mielina. Algumas fibras exibem o início de fragmentação com formação de ovóides de mielina, pois se encontram em fase mais avançada de degeneração. Os macrófagos passam a digerir a mielina após começarem a invadir o coto distal, penetrando nas regiões entre a mielina e o axônio. Os ovóides de mielina são formados por fragmentos de mielina dentro do citoplasma das células de Schwann ou de macrófagos revestidos pela lâmina basal da célula de Schwann (Martinez *et al.*, 2014).

As mudanças que ocorrem nas fibras nervosas levam ao recrutamento de macrófagos que promovem a fagocitose dos restos celulares e limpeza da área. Existem evidências de que as células de Schwann participam desse processo. Enquanto isso ocorre, as células de Schwann passam por uma série de mitoses, evento crucial para a regeneração nervosa subsequente. A proliferação das células de Schwann forma um “túnel” revestido pela lâmina basal que são as bandas de Büngner. Modificações fenotípicas somam-se a essas alterações proliferativas. Desse modo, as células de Schwann, tanto mielinizantes quanto não mielinizantes, passam a produzir moléculas de adesão celular (CAM), como L<sub>1</sub> e moléculas neuronais gliais de adesão celular (NG-CAM), geralmente características de células não mielinizantes, e fatores neurotróficos – fator de crescimento dos nervos (NGF) e receptores de NGF (NGFR). Outras citocinas como a interleucina -6 (IL-6) e o fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ), também são expressas no coto distal do nervo lesionado, o que caracteriza a degeneração Walleriana como um processo inflamatório (Martinez *et al.*, 2014).

Após a lesão nervosa periférica, uma sequência de eventos complexos e finamente regulados iniciam a remoção do tecido danificado e o processo de reparo. Nossa compreensão do processo de regeneração do nervo periférico aumentou significativamente nas últimas décadas. Agora sabemos que a resposta de um nervo à lesão não está simplesmente situada no local do dano, mas também envolve os corpos celulares localizados na medula espinal e nos gânglios. As células de Schwann, bem como os macrófagos e as células inflamatórias desempenham papéis críticos nesse processo. Para que ocorra uma regeneração nervosa adequada, deve haver uma cooperação das forças degenerativas e regenerativas (Burnett e Zager, 2014).

As lesões nervosas desencadeiam a conversão de células de Schwann mielinizantes e não-mielinizantes (Remak) em uma desdiferenciação celular especializada para promover o reparo. Essas células de Schwann de reparo fornecem os sinais e pistas necessários para a sobrevivência dos neurônios lesionados, regeneração axonal e reinervação de alvos. A conversão para células de Schwann de reparo envolve alteração no fenótipo, juntamente com diferenciação ou ativação alternativa, uma combinação que é típica de conversões de tipos celulares, geralmente chamadas de reprogramação direta. Portanto, a reprogramação de células de Schwann induzidas por lesão, envolve a regulação negativa dos genes da mielina, combinados com a ativação de um conjunto de características de suporte à reparação, incluindo a regulação positiva de fatores tróficos, elevação de citocinas, como parte da resposta imune inata. Há também

a degradação de mielina por ativação de autofagia da mielina em células de Schwann e recrutamento de macrófagos juntamente com a formação de trilhas de regeneração, as bandas de Büngner, para direcionar seus axônios para seus alvos. Este programa de reparo é controlado transcricionalmente por mecanismos que envolvem o fator de transcrição c-Jun, que é rapidamente up-regulado nas células de Schwann após a lesão. Na ausência de c-Jun, a lesão resulta na formação de célula reparadora disfuncional, morte neuronal e falha na recuperação funcional. Embora o c-Jun não seja necessário para o desenvolvimento de células de Schwann, ele desempenha um papel central para a reprogramação das células de Schwann mielinizantes e não-mielinizantes (Remak) em células de reparo após a lesão (Figura 4) (Jessen e Mirsky, 2016).

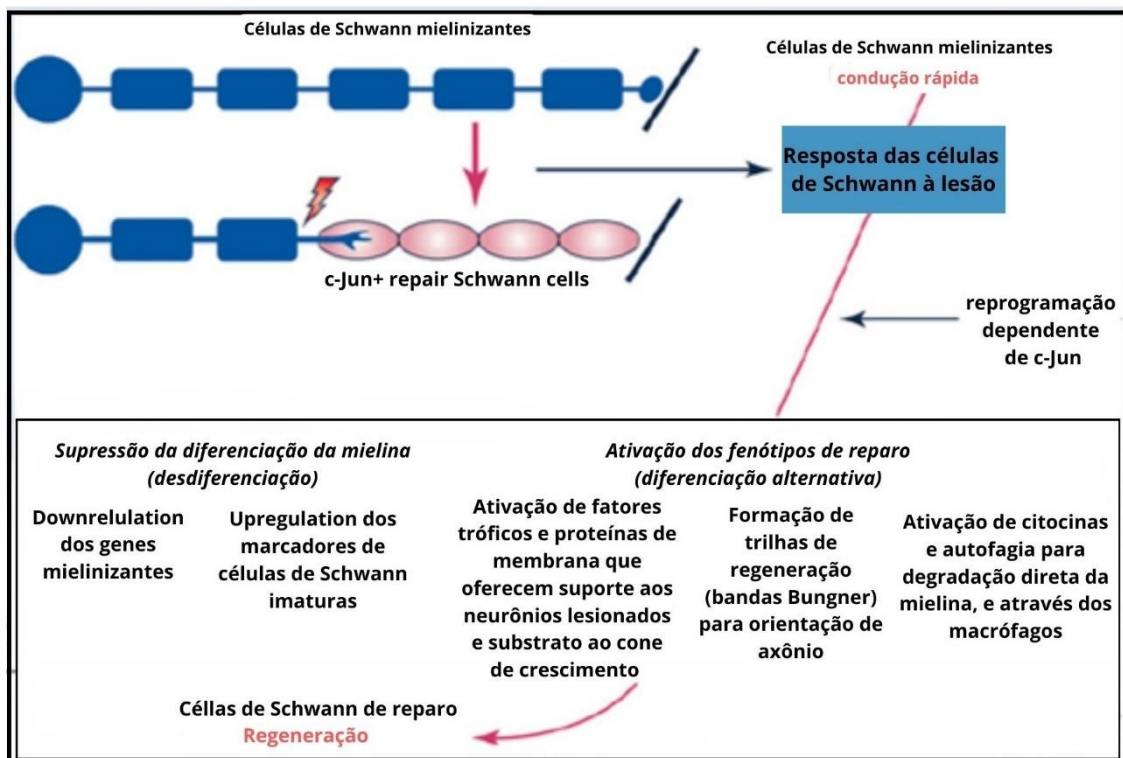


Figura 4: Reprogramação da célula de Schwann após lesão nervosa periférica. Fonte: Traduzido de Jessen e Mirsky, 2016.

#### 1.4 EPIGENÉTICA: HISTONAS DESACETILASES (HDACS)

O termo o Epigenética foi criado por Waddington (1942), o qual ele definiu como o estudo dos "mecanismos causais" que permitem que os genes do genótipo provoquem efeitos fenotípicos. Anteriormente, Waddington (1939) já havia empregado o termo epigenótipo para descrever "o conjunto de organizadores e relações organizadoras a que um tecido específico estará sujeito durante o desenvolvimento".

Dessa forma, a epigenética, na visão de Waddington, abordava um tema similar ao que atualmente chamaríamos de biologia do desenvolvimento. Waddington contestou a perspectiva simplista de muitos geneticistas que acreditavam em uma correspondência direta entre genes e características fenotípicas (Waddington, 1939). Na visão de Waddington, o desenvolvimento embrionário era guiado pela interação complexa entre múltiplos genes e o micro-ambiente na formação de um fenótipo criando o termo “*epigenetic landscape*” (paisagem epigenética) (Figura 5). É importante destacar que trata-se de um período em que ainda não se entendia completamente a natureza física e química do DNA e, conseqüentemente, seu papel na herança genética. O conceito de "paisagem epigenética" de Waddington (1940) representa visualmente o conjunto de escolhas com os quais uma célula embrionária se depara durante o desenvolvimento embrionário, indicando a ligação entre o micro-ambiente e a genética.

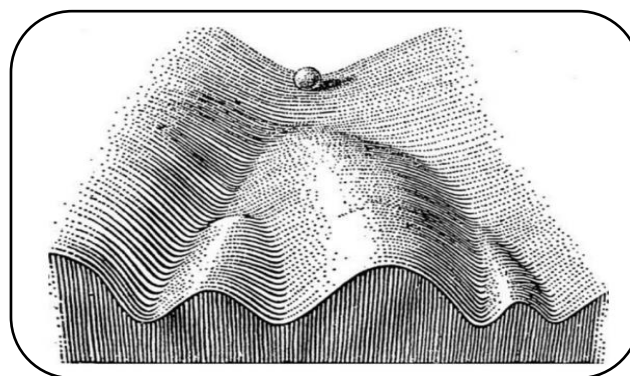


Figura 5: Representação proposta por Waddington de “*Epigenetic landscape*” ilustrando as diversas opções de decisões (representadas pelos vales) que uma célula (representada como uma esfera) pode fazer durante o seu processo de desenvolvimento. Extraído de Waddington, 1940.

É importante ressaltar que os mecanismos epigenéticos atuam de forma reversível, podendo regular de forma dinâmica e expressão gênica. Isso significa que diferentes fenótipos podem ser gerados a partir da mesma sequência de DNA, através de modificações epigenéticas, e não em decorrência de mutações, sem alteração, portanto, nas bases (adenina (A), timina (T), citosina (C), guanina (G)) do DNA. As marcas transitórias são interessantes porque promovem mudanças no modelo de cromatina em resposta a estímulos internos e externos. Ao fazer isso, elas regulam o acesso e/ou a capacidade de processamento da maquinaria de transcrição necessária para interpretar o modelo de DNA subjacente (Zhao *et al.*, 2021).

Os cromossomos, que se encontram no núcleo das células dos organismos eucariontes, são estruturas lineares formadas por DNA de dupla hélice. Essas estruturas contêm os *loci* gênicos, que são responsáveis por abrigar os genes, que em última instância, estão relacionados com as características físicas específicas de cada indivíduo, ou fenótipo. Cada cromossomo em uma célula eucariótica é composto por uma única molécula de DNA de dupla hélice que se associa às proteínas histonas e não-histonas, formando uma estrutura complexa denominada cromatina. Durante o processo de divisão celular, a cromatina se torna intensamente compactada para formar a estrutura conhecida como cromossomo, especificamente na etapa de metáfase da divisão. O que os diferencia é que o cromossomo representa a cromatina em um estado de maior compactação (Figura 6). É importante frisar que a cromatina não possui uma estrutura homogênea, mas sim apresenta partes altamente condensadas, conhecidas como heterocromatina, e partes com menor condensação, denominadas eucromatina. A extensão de uma molécula de DNA, em número de nucleotídeos, tem um tamanho muito superior ao núcleo de uma célula eucarionte. Por essa razão, as proteínas histonas desempenham um papel relevante na compactação da cromatina ao formar, juntamente com o DNA, os nucleossomos, as unidades funcionais da cromatina (Maia e Silva, 2020).

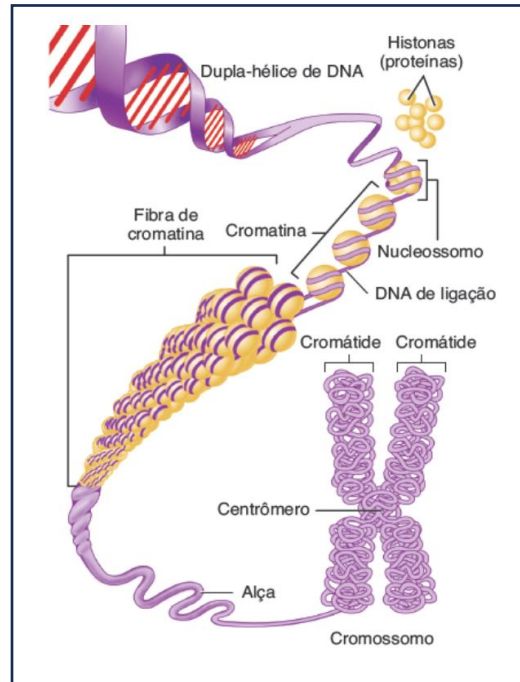


Figura 6: Organização do DNA em um cromossomo em uma célula em divisão. As moléculas de DNA e suas histonas formam um par de cromátides, que são mantidas unidas por um centrômero. (Tortora e Derrickson, 2016)

As histonas nucleares (H2A, H2B, H3 e H4) são proteínas fundamentais na organização do DNA dentro do núcleo das células, sendo ricas em aminoácidos básicos, como arginina e lisina. Esses aminoácidos possuem cargas positivas e, portanto, podem se ligar ao DNA, que é negativamente carregado, facilitando a compactação do DNA ao redor das histonas para formar o nucleossomo (Figura 7) (Ruijter *et al.*, 2003; Campos e Reinberg, 2009; Yu *et al.*, 2020).

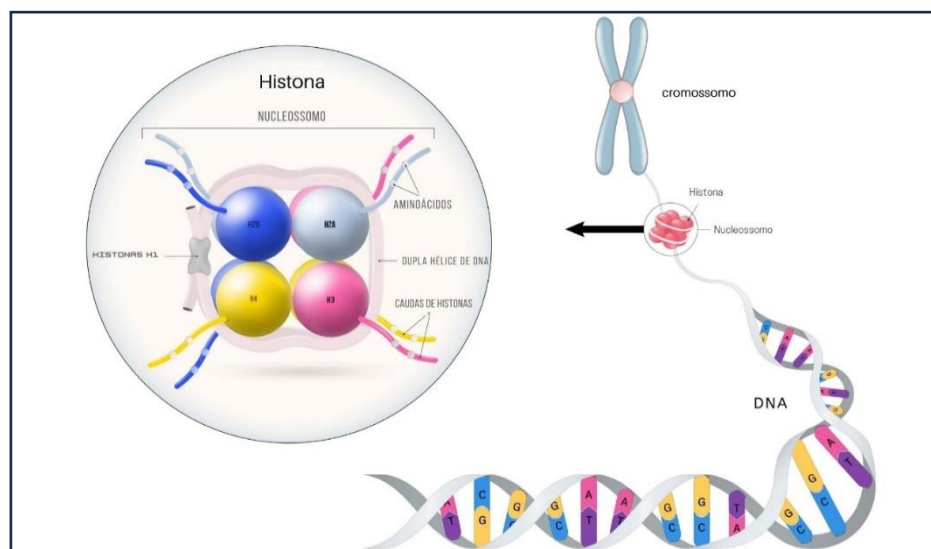


Figura 7: Estrutura do nucleossomo em vários níveis de organização. Reproduzido e adaptado de: <https://www.istockphoto.com/br/vetor/vetor-histones-prote%C3%ADnas-histonas-nucleossomo-cromossomo-e-dna-dupla-h%C3%A9lice-gm1440946596-480775388>, (28/11/2023).



A histona H1 não está incluída no núcleo das histonas, mas sim se conecta ao DNA ligante (que une nucleossomos vizinhos), sendo classificada como uma histona de ligação, participando na estruturação e organização da cromatina. As caudas N-terminais das histonas se estendem dos nucleossomos e são substratos para complexos proteicos contendo enzimas de remodelagem da cromatina. Tais complexos podem acoplar em regiões regulatórias e, através de atividade enzimática, regular a quantidade e a qualidade das modificações pós-traducionais (MPT) em resíduos específicos de amino ácidos, como acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, entre outros. A presença desses grupos químicos altera o grau de expressão dos genes que estão embalados em nucleossomos que contêm histonas modificadas (Happel e Doenecker, 2009; Bustin *et al.*, 2005).

A estrutura densa do nucleossomo, que surge principalmente da interação iônica entre as histonas, com carga positiva, e o DNA, com carga negativa, limita a acessibilidade da maquinaria de transcrição. Domínios de heterocromatina podem ser convertidos em domínios eucromáticos pela ação da enzima histona acetil-transferase (HAT), resultando numa estrutura de cromatina frouxa e acessível, facilitando o acoplamento dos complexos transcricionais e, conseqüentemente, promoção da expressão gênica. Por outro lado, a atividade Histona Desacetilase (HDAC) atua desacetilando os resíduos de lisina e conferindo uma carga global positiva à cadeia lateral das histonas, reconstituindo assim a heterocromatina, uma conformação de cromatina que limita a acessibilidade dos complexos transcricionais (Park e Kim, 2020; King *et al.*, 2021).

Em seres humanos, as 18 HDACs identificadas são divididas em quatro grupos distintos, os quais variam em termos de estrutura, localização e ligação aos co-fatores (King *et al.*, 2021), podendo ser divididas em duas famílias principais. Tais famílias de HDACs são diferenciadas quanto à presença de um domínio de desacetilase conservado (região da proteína responsável por sua atividade catalítica) e quanto à sua dependência por co-fatores específicos (íons necessários para a atividade enzimática ótima), sendo ela a família das HDACs e a família das Sirtuína. A família das HDACs é ainda sub-dividida em Classe I (HDAC1, 2, 3 e 8), Classe II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 e 10) e Classe IV (HDAC11), com base na semelhança de sequência com a desacetilase de levedura Rpd3, que são amido-hidrolases que necessitam do íon  $Zn^{++}$ . As enzimas da Classe II são divididas ainda em Classe IIa e Classe IIb, de acordo com a estrutura de seus domínios. As sirtuínas são classificadas como HDACs da Classe III, que utilizam de dinucleotídeo de

nicotinamida adenina (NAD) como cofator para sua atividade catalítica (Figura 8). Até agora, foram identificadas e classificadas 18 HDACs de mamíferos (Park e Kim, 2020).

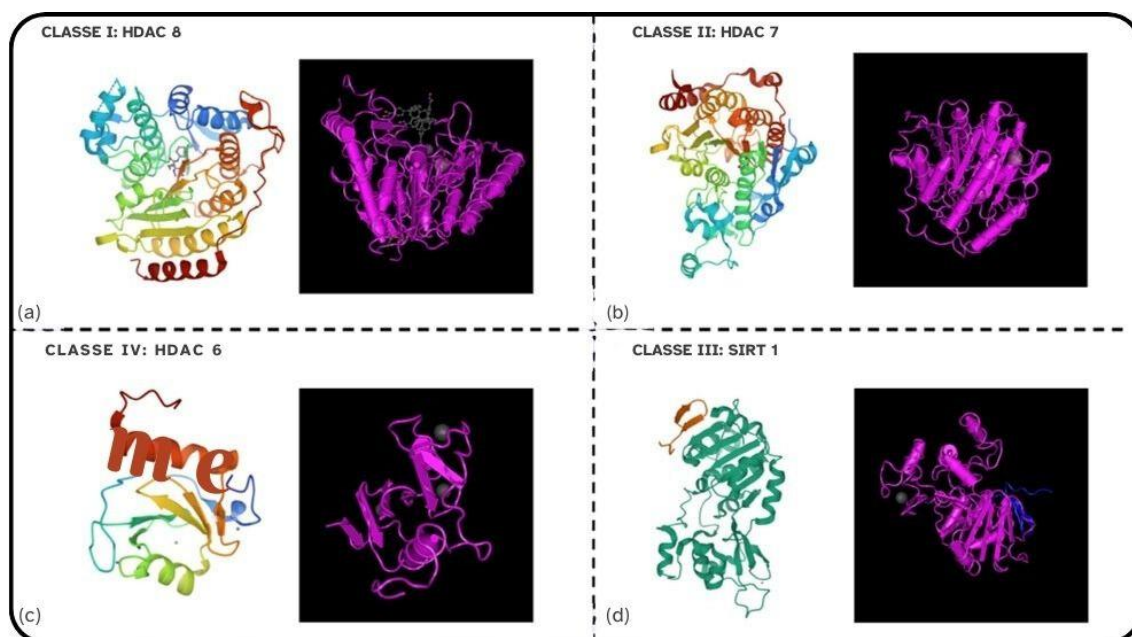


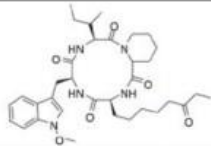
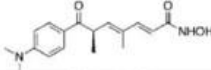
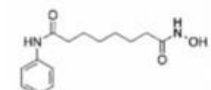
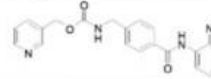
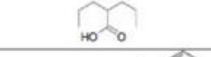
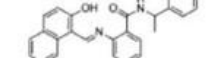
Figura 8: A estrutura cristalina de HDACs. A estrutura tridimensional da HDAC8, que foi a primeira histona desacetilase humana a ter sua estrutura totalmente determinada, é composta por 11 a 13 hélices  $\alpha$  e 8 folhas  $\beta$  (a). A proteína HDAC7 tem uma estrutura única, que é composta por um domínio catalítico estrutural central conservado localizado em seu terminal C (b). HDAC6 se distingue por sua localização principalmente no citoplasma (c). Por outro lado, o domínio estrutural catalítico da SIRT1 tem uma forma elíptica e é formado por dois domínios grandes e dois pequenos, somando aproximadamente 270 resíduos de aminoácidos (d) (Han et al., 2023).

### 1.5 INIBIDORES DE HDACS (iHDAC)

Os inibidores das HDACs (iHDACs) promovem a acetilação de histonas e proteínas não-histonas, exercendo uma ação anti-proliferativa. Tem sido descrito na literatura que os iHDACs bloqueiem o sistema de reparo do DNA, interrompam o ciclo celular, provoquem apoptose e modifiquem a expressão gênica (Amin *et al.*, 2018). Os iHDACs podem ser naturais ou sintéticos e possuem uma variedade de estruturas, diferentes características de seletividade e de atividades biológicas. Comumente, um iHDAC é composto por uma porção que se liga ao metal ou um grupo funcional, um grupo de proteção e um ligante. O grupo de ligação ao metal facilita a ligação catalítica do metal ao sítio ativo do HDAC. O grupo de proteção interage com os aminoácidos no local de ligação da lisina. Por fim, o ligante, que possui uma semelhança estrutural com

a cadeia de carbono presente no substrato de acetil-lisina, conecta o grupo de ligação ao metal e o grupo de proteção, permitindo a interação com o sítio ativo do HDAC (Shukla e Tekwani, 2020). Estratégias alternativas também foram propostas visando alcançar a inibição seletiva das HDACs, focalizando na interrupção das interações entre proteínas que são essenciais para a atividade das HDACs, ao invés do método tradicional de quelatação íons de zinco no local ativo (Maolanon *et al.*, 2016).

Os inibidores da HDAC foram classificados em quatro classes principais, com base nas propriedades químicas do inibidor (Quadro 1). A maior parte dos iHDACs disponíveis não são seletivos, agindo sobre todas as isoformas de HDAC, sendo frequentemente chamados de inibidores pan-HDAC. Os iHDAC seletivos, por outro lado, podem ser categorizados como específicos de classe (inibindo múltiplas isoformas dentro de uma única classe) ou específicos de isoforma (inibindo uma isoforma específica de HDAC). Esforços consideráveis estão sendo realizados para criar inibidores seletivos para isoformas de inibidores de HDACs. Um conceito inovador na formação de inibidores HDACi é a junção da inibição de proteínas quinases e HDACs em uma única molécula. A eficácia de compostos com estruturas diversas como inibidores de HDACs sugere que o mecanismo de ação desses compostos pode não se restringir apenas ao bloqueio do sítio catalítico, mas também pode envolver a ligação da periferia da enzima com outras proteínas, independentemente da atividade da desacetilase (Marks, 2014; Shukla e Tekuani, 2020).

Class of HDAC inhibited	Type of HDAC inhibitor	Name of inhibitor	Structure
Class I and II	Cyclic Tetrapeptides	Apicidin	
	Hydroxamates	TSA	
		SAHA	
	Benzamides	MS 275	
Class III	Short-chain fatty acid	Valproic acid	
		Sirtinol	

Quadro 1: Inibidores de HDACs de Classes I, II e III.

## 1.6 REPARO TECIDUAL E INFLAMAÇÃO

O reparo tecidual é um processo complexo e finamente regulado que pode levar à cicatrização ou à regeneração dos tecidos após uma injúria. O reparo de tecidos lesionados requer uma transição bem-sucedida da fase inflamatória para a fase resolutive. Embora os detalhes específicos do processo de reparo tecidual variem dependendo do tipo de tecido e da natureza da lesão, os objetivos gerais são os mesmos: restaurar e manter a homeostase e, quando possível, recuperar e preservar a função do tecido (Londono *et al.*, 2018).

O reparo tecidual pode ser didaticamente dividido em diferentes etapas. A primeira fase da cicatrização fisiológica é a etapa inflamatória na qual o processo de cicatrização é ativado durante a hemostasia e coagulação, e pode ser segmentada em uma fase inicial, com a convocação de neutrófilos, e uma fase posterior, com a chegada e transformação de monócitos. Nas primeiras horas após uma injúria, a função dos neutrófilos é vital por sua habilidade de fagocitose e secreção de proteases, que eliminam bactérias locais e auxiliam na degradação do tecido necrosado. Adicionalmente, eles servem como agentes quimio-atraentes para outras células que participam na fase inflamatória. Cerca de 3 dias após a injúria, os monócitos infiltram na área da injúria e dão suporte ao processo em curso, se diferenciando em macrófagos e participando ativamente da fagocitose de patógenos e *debris* celulares, além de secretar fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas. A segunda fase, conhecida como fase de proliferação, ocorre aproximadamente 3 a 10 dias após a injúria formar tecido de granulação e restaurar a rede vascular. A fase final do processo de reparo tecidual é a remodelação no qual o tecido é organizado e fortalecido para se assemelhar ao tecido original. (Reinke e Sorg, 2012).

A inflamação desempenha um papel crítico durante o reparo tecidual sendo ativada como parte da resposta imunológica inata do organismo. Durante a fase inflamatória, patógenos invasores e *debris* de tecidos no local da lesão são eliminados pelas células imunológicas do sistema inato, um passo essencial para a subsequente regeneração do tecido (Moon *et al.*, 2022). Embora os processos inflamatórios possam parecer prejudiciais aos tecidos, especialmente em casos de inflamação crônica, eles são, na verdade, protetores e essenciais para a reparação e regeneração. Se a integridade do

tecido e a homeostase são restauradas, a inflamação se resolve durante o reparo. Contudo, se a fase inflamatória se sustenta de forma prolongada pode resultar em fibrose patológica, comprometendo a função normal do tecido e podendo levar a danos consideráveis (Oishi e Manabe, 2018).

A inflamação aguda ocorre rapidamente e tem curta duração, geralmente de alguns minutos a poucos dias, e é marcada pela exsudação de fluidos e proteínas do plasma, além do acúmulo de leucócitos, predominantemente neutrófilos que tem como principal função fagocitar microrganismos, especialmente aqueles que foram opsonizados, assim como materiais oriundos de células mortas. Além disso, os neutrófilos liberam componentes presentes em seus grânulos e outras substâncias que possuem ação antimicrobiana, capazes de eliminar microrganismos fora da célula, mas que podem também causar danos a tecidos saudáveis. (Kumar *et al.*, 2023).

O sistema imunológico inato age instantaneamente perante microrganismos e células danificadas, e a resposta é praticamente a mesma diante de múltiplas exposições. Os receptores da imunidade inata reconhecem estruturas comuns a grupos de microrganismos semelhantes e não conseguem diferenciar pequenas diferenças entre eles. Os leucócitos e proteínas plasmáticas desempenham um papel crucial na defesa inata contra microrganismos, circulando no sangue e sendo mobilizados para locais de infecção e lesão. Aqui, eles realizam funções efetoras que eliminam microrganismos e iniciam a recuperação do tecido danificado. Quando os monócitos infiltram no sítio da lesão eles dão origem aos macrófagos no tecido e entram no tecido, se tornando cada vez mais numerosos e podem se tornar a população dominante em algumas respostas. A chegada de células e proteínas ao local de inflamação depende de alterações reversíveis que ocorrem nos vasos sanguíneos próximos ao tecido infectado ou danificado. Essas mudanças envolvem o aumento do fluxo sanguíneo para o tecido devido à vasodilatação, o aumento da aderência dos leucócitos que circulam no revestimento endotelial das vênulas e o aumento da permeabilidade dos capilares e vênulas para os fluidos e proteínas plasmáticas. Essas alterações são mediadas por citocinas e pequenas moléculas mediadoras inicialmente derivadas de células sentinelas residentes no tecido, como mastócitos, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais, em resposta à estimulação por PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) e DAMPs (padrões moleculares associados ao dano). Com a evolução do processo inflamatório, os

mediadores podem também ser originados de leucócitos recém-recrutados e ativados, bem como de proteínas do sistema complemento (Abbas *et al.*, 2023).

Os macrófagos, células fagocíticas residentes dos tecidos ou oriundas de monócitos circulantes, regulam processos como a angiogênese e a remodelagem da matriz extracelular (MEC), bem como a transição entre a fase da inflamação e da resolução. Na verdade, os macrófagos exercem funções significativas e variadas na maioria, se não em todas as etapas da inflamação e resolução, assim como no remodelamento patológico que pode contribuir para processos de doenças. Os macrófagos são células efetoras principais que medeiam a imunidade inata, exibindo fenótipos altamente plásticos e uma grande diversidade funcional. Além de sua função na defesa do hospedeiro, os macrófagos desempenham papéis cruciais no desenvolvimento de tecidos, na manutenção da homeostase dos tecidos e na regeneração dos tecidos. Durante a inflamação aguda e os subsequentes processos de cicatrização desencadeados pela lesão, os macrófagos são vitais para o reparo adequado e a recuperação da homeostase (Oishi e Manabe, 2018).

Comumente, os macrófagos com diferentes funções são categorizados em dois subgrupos, M1 e M2. Os macrófagos M1, que são ativados de maneira clássica, desempenham um papel crucial na defesa primária do organismo contra patógenos. Por outro lado, os macrófagos M2, ativados alternativamente, atuam na recuperação de lesões ou danos teciduais induzidos pelos macrófagos M1 e participam no estímulo da produção de anticorpos na imunidade adaptativa humoral (Li *et al.*, 2022).

Ao longo da última década, a nova classificação dos macrófagos em Ly6C<sup>hi</sup> e Ly6C<sup>lo</sup> tem sido extensivamente usada para estudar macrófagos originados de monócitos e para descrever o estado exato dos macrófagos em um complexo microambiente interno (Murray e Wynn, 2011). Este sistema de classificação distingue duas populações de macrófagos que são diferentes em fenótipo, função e até mesmo origem. A glicoproteína Ly6C é expressa em macrófagos/precursos de células dendríticas durante a fase intermediária de desenvolvimento. A expressão diferenciada de Ly6C permite identificar populações de macrófagos com funções distintas, seja em condições normais ou patológicas. (Ramachandran *et al.*, 2012; Nahrendorf *et al.*, 2019).

Os macrófagos que se originam dos monócitos são categorizados como macrófagos CD11B<sup>hi</sup>F4/80<sup>hi</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (ou seja, macrófagos Ly6C<sup>hi</sup>) e macrófagos CD11B<sup>hi</sup>F4/80<sup>hi</sup>Ly6C<sup>lo</sup> (ou seja, macrófagos Ly6C<sup>lo</sup>), baseando-se na expressão de Ly6C,

uma glicoproteína de superfície celular. Durante a inflamação, os macrófagos Ly6C<sup>hi</sup> evoluem a partir de monócitos clássicos CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>lo</sup>Ly6C<sup>hi</sup> recrutados (equivalentes aos monócitos humanos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), e depois são transformados em macrófagos Ly6C<sup>lo</sup> (Lin *et al.*, 2009; Ingersoll *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2021)

## 1.7 LESÕES TRAUMÁTICAS DO SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

As lesões dos nervos periféricos são uma condição bastante comum, com mais de 300.000 casos reportados na Europa e mais de 200.000 procedimentos de reparo do nervo periférico realizados anualmente nos Estados Unidos (Khalifeh, 2022). Essas lesões podem ser extremamente graves e causar incapacidade permanente. Mesmo com a capacidade de regeneração do sistema nervoso periférico, é frequente a ocorrência de uma parcial perda funcional ou um comprometimento irreversível da função. Aproximadamente 33% dessas lesões não apresentam recuperação total dos nervos, o que resulta em recuperação funcional insatisfatória, incluindo perda parcial ou total da função motora e sensorial, dor crônica, atrofia e fraqueza muscular. Conseqüentemente, a perda da função normal pode frequentemente levar a morbidades ao longo da vida e incapacidade permanente (Wang *et al.*, 2018).

O tipo de lesão mais comum em nervos periféricos é o estiramento, que ocorre quando ele é exposto a uma força excedente à sua, podendo resultar numa ruptura completa do nervo. Já as lacerações também ocorrem com grande frequência no sistema nervoso periférico (SNP), representando cerca de 30% das lesões graves. Embora essas lesões possam resultar em transecções completas dos nervos, é mais comum que haja algum elemento neural de continuidade preservada. Outra forma de lesão que acomete o SNP é a compressão que pode ser desencadeada por deformação mecânica ou isquemia. A forma mais extrema desse tipo de condição está associada à interrupção da transmissão do impulso nervoso, sem que haja ruptura ou transecção das fibras nervosas (Khaled *et al.*, 2023).

O trauma é uma das causas mais comuns de lesões em nervos periféricos na população em geral e entre os jovens (Lavorato *et al.*, 2023). Qualquer tipo de acidente cortante ou de forte impacto que provoque corte, contusão, esmagamento, tração ou rompimento pode levar a lesão de um ou mais nervos periféricos. Dentre eles podemos

citar os acidentes automobilísticos e motociclísticos, acidentes com objetos perfurocortantes, projéteis de arma de fogo, quedas e equipamentos de trabalho como serra elétrica e furadeira (Batista e Almeida, 2008).

As lesões do sistema nervoso em humanos foram classificadas em 1941 por Seddon em três tipos: neurotmeze, na qual há a divisão anatômica completa do nervo; axonotmeze, no qual a lesão danifica os axônios, porém a arquitetura interna do nervo está razoavelmente preservada e neuropraxia que ocorre na ausência de degeneração periférica. Já Sunderland (1951), direcionou sua atenção não apenas para o potencial anatômico da lesão como também para o potencial regenerativo, classificando-as em cinco graus (Figura 9): lesão de primeiro grau, no qual a condução está bloqueada no local da lesão, mas todos os componentes do nervo, incluindo o axônio, estão preservados, não há degeneração Walleriana e o fator responsável pelo bloqueio da condução é totalmente reversível; lesão de segundo grau, quando a separação do axônio e as mudanças associadas, como a degeneração Walleriana, acontecem distalmente ao local da lesão; lesão de terceiro grau em que tem-se desintegração axonal (degeneração Walleriana), e a continuidade do endoneuro também é destruída; lesão de quarto grau, na qual há uma desorganização completa da estrutura interna do nervo mas a continuação mantêm-se preservada e as células de Schwann e a regeneração de axônios podem formar um neuroma. Por último, na lesão de quinto grau ocorre a ruptura completa do nervo.



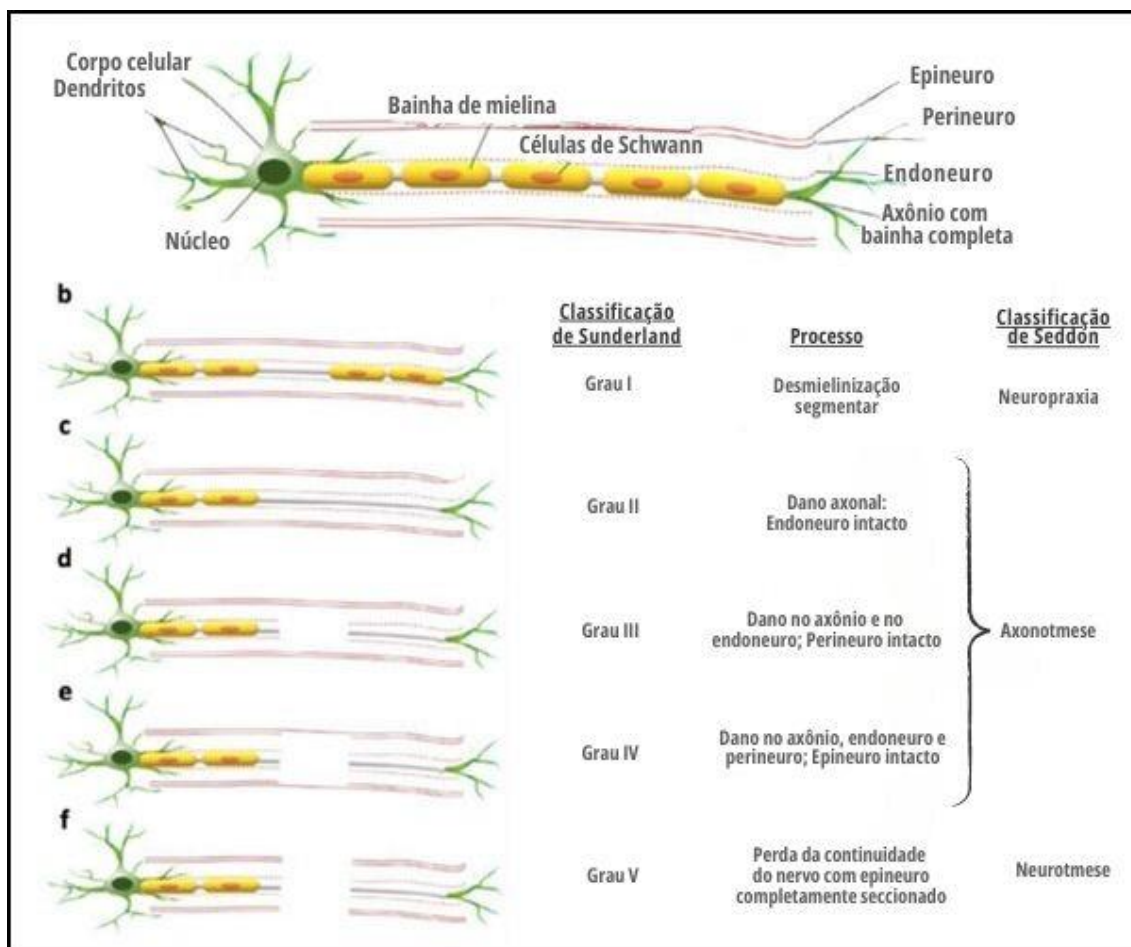


Figura 9: Classificação das Lesões dos Nervos Periféricos. (a) Estrutura de um nervo periférico intacto, (b) lesão de primeiro grau (neurapraxia), (c) lesão de segundo grau (axonotmese), (d) lesão de terceiro grau (axonotmese), (e) lesão de quarto grau (axonotmese) e (f) lesão de quinto grau (neurotmese). Traduzido e adaptado de Vijayavenkataraman, 2020.

## 1.8 ESTRATÉGIAS DE REPARO

A abordagem inicial para tratar lesões nervosas traumáticas é amplamente baseada no mecanismo e no tipo da lesão. Para transecções de nervos, os melhores resultados são obtidos com o reparo primário sem tensão das extremidades proximais e distais saudáveis do nervo. É crucial uma reparação sem tensão, pois a tensão no local de co-aptação cria um ambiente que não favorece a regeneração nervosa, causando isquemia tecidual e formação de cicatrizes. Comumente, se a lacuna for de até 3 cm, é possível executar uma reparação sem tensão, especialmente se o local da lesão permitir a obtenção de comprimento extra. No entanto, mesmo espaços pequenos podem ser desafiadores para preencher com uma reparação sem tensão em certas áreas e podem necessitar de um

enxerto intermediário. Se os espaços forem superiores a 3 cm em qualquer local, geralmente é preciso usar um enxerto intermediário (Smith et al, 2019).

Como alternativa para permitir a regeneração do nervo com espaços maiores entre os cotos, está o autoenxerto (Figura 10), técnica considerada padrão ouro no reparo de nervos humanos, no qual o nervo sural é o nervo tipicamente utilizado como ponte na região do “gap” (Goulart *et al.*, 2014). Porém esse tipo de reparo tem suas limitações, como a possibilidade de necrose das células de Schwann no enxerto após o transplante, devido à insuficiente perfusão da vascularização adjacente. Isso ocorre quando o enxerto é excessivamente espesso e a revascularização não atinge o seu centro, ou quando o enxerto é muito extenso e a vasculatura ao redor não consegue prover o suficiente em termos de nutrientes e oxigênio para todo o enxerto, resultando em uma recuperação funcional inadequada. Outras limitações compreendem a necessidade de várias intervenções cirúrgicas invasivas, um maior risco de infecção e a disponibilidade limitada de tecido para enxerto em casos sérios onde se requer uma grande quantidade de tecido doador (Lackington, 2016; Khalifeh, 2022).

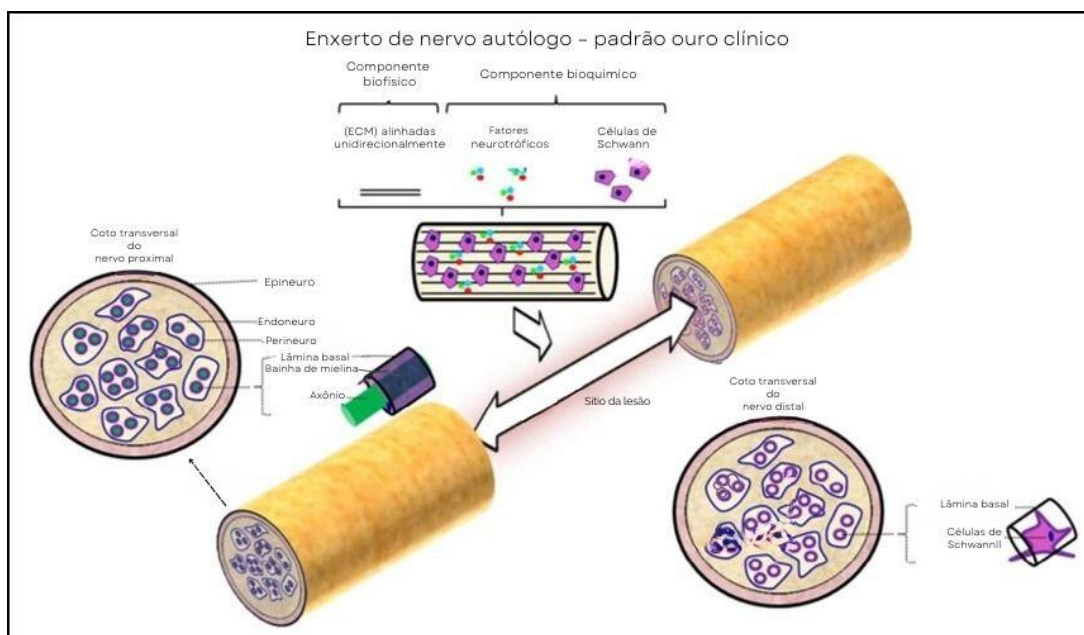


Figura 10: Autoenxerto e considerações para o desenvolvimento de terapêuticas alternativas. Idealmente, o local da lesão é reparado e seguido pela reinervação do alvo distante, resultando na recuperação da função nervosa. A movimentação das células de Schwann através do local da lesão é essencial para um reparo bem-sucedido. Contudo, em lacunas maiores, isso é frequentemente impedido pelo envelhecimento natural das células. No autoenxerto, esse envelhecimento natural das células de Schwann é mitigado pela presença de células de Schwann autólogas em um estado de desdiferenciação, juntamente com tecido conjuntivo alinhado à matriz extracelular e uma abundância de fatores neurotróficos presentes no enxerto (Lackington *et al.*, 2016).

A utilização de aloenxertos (nervos provenientes de cadáveres processados) também é uma opção quando há um espaço entre os cotos maior que 3cm, porém a alta possibilidade de rejeição por parte do receptor deve ser considerada. Mesmo com o uso de técnicas de reparo microcirúrgico cuidadosos, que visam reduzir os impactos negativos da cicatrização nervosa prejudicada, muitas vezes são observados resultados funcionais insatisfatórios devido à recuperação neural incompleta. Do ponto de vista biológico, a cicatrização e a regeneração nervosa no local da lesão são fatores significativos que impactam a recuperação ideal do nervo danificado, limitando, de fato, a restauração funcional completa. Portanto, a fibrose perineural após a reparação ainda representa um desafio clínico persistente e, atualmente, ainda não foi adequadamente solucionada (Wang et al., 2018).

Os progressos na engenharia de tecidos resultaram na criação de guias de regeneração nervosa (NGCs), popularmente chamados de tubos, que representam uma alternativa promissora para evitar as complicações geradas pelos autoenxertos (Stewart et al., 2020). Tradicionalmente, os tubos utilizados como alternativa para o autoenxerto eram feitos de material não biodegradável, o que resultava em complicações como compressão crônica do nervo, fibrose e a necessidade de uma segunda cirurgia para removê-los (Goulart et al., 2016). A técnica de tubulização utilizando polímeros biodegradáveis e biocompatíveis (Figura 11) vem sendo estudada como uma melhor alternativa em relação aos tubos não biodegradáveis, já que suas propriedades estruturais, mecânicas e morfológicas também podem limitar sua produção e utilização na clínica (Pestana et al., 2018). Tubos reabsorvíveis têm sido utilizados com sucesso na regeneração nervosa minimizando a resposta inflamatória e prevenindo a compressão nervosa, além da possibilidade de serem associados com outras estratégias como o enxerto de células e o uso de fatores tróficos (Goulart et al., 2016).

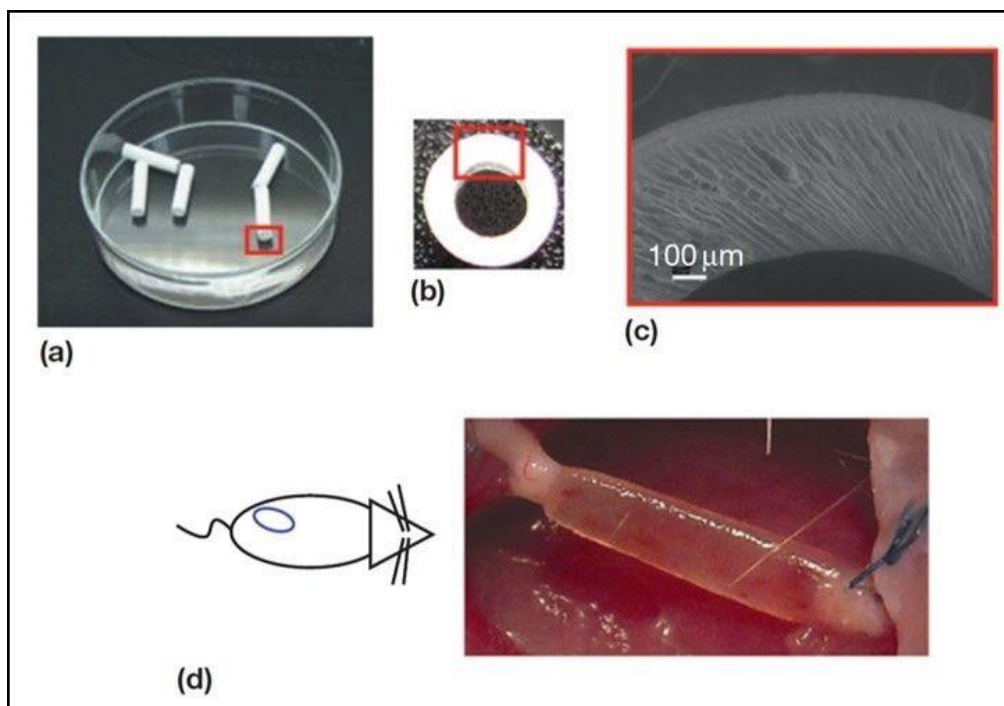


Figura 11: Exemplo de tubos feitos de colágeno. (a) Vistas macroscópicas longitudinais e (b) transversais dos tubos de colágeno; (c) os dispositivos mostram um padrão microporoso alinhado ao longo da parede do tubo; (d) morfologia bruta de um tubo implantado em um gap de nervo ciático de rato de 10 mm, 8 dias após o implante. Retirado de Sannino *et al.*, 2011.

A utilização de terapia celular (células tronco mesenquimais, células de Schwann, células da glia embainhante olfatória) e de terapias gênicas (plasmídeos de VEGF e G-CSF, isolados ou combinados, entre outros) também vem sendo amplamente estudadas pelo nosso laboratório, e os resultados têm sido bastante promissores na combinação de abordagens moleculares com novas formas de reparo cirúrgico seguido de terapias que preservam o trofismo muscular. A associação de terapias como as celulares e farmacológicas, que melhoram o crescimento axonal com tubos biodegradáveis que preenchem o “gap” entre os cotos proximal e distal do nervo após uma lesão, já se mostraram ser eficazes para promover uma regeneração nervosa (Oliveira *et al.*, 2010).

## 1.9 TERAPIA EPIGENÉTICA

O uso de medicamentos que visam especificamente alterações epigenéticas possibilita o direcionamento de uma variedade de alvos. Isso pode, em teoria, abordar uma ampla gama de mecanismos genéticos relacionados a doenças do sistema nervoso

central (SNC), no entanto, as pesquisas que estudam a expressão e as funcionalidades do desenvolvimento das HDACs nos nervos periféricos em desenvolvimento ainda são limitadas. Estudos pré-clínicos mostram que inibidores de histona desacetilases, impactam mediadores de inflamação neuroimune (citocinas e fatores pró-apoptóticos), neurotrofinas (derivadas do cérebro). fator neurotrópico (BDNF) e fator de crescimento nervoso (NGF)), canais iônicos, receptores ionotrópicos, bem como patoproteínas ( $\beta$ -amilóide, proteína tau e  $\alpha$ -sinucleína). Com base neste perfil de atividades, os epifármacos podem ser favoráveis como tratamento para doenças neurodegenerativas. (Gladkova *et al.*, 2023).

Estudos mostram que o ácido valproico, um inibidor de HDACs, reduz a neuroinflamação e morte neuronal no nervo periférico em modelo animal. Maiores discussões a respeito desse fármaco serão trazidas a seguir.

## 1.10 TERAPIA FARMACOLÓGICA

Até o momento não existe terapia medicamentosa estabelecida na prática clínica para aumentar a velocidade e a qualidade da regeneração nervosa (Bota e Fodor, 2019). As opções de tratamento medicamentoso atualmente disponíveis para lesões do nervo periférico (PNI) geralmente visam aliviar os sintomas decorrentes, como dor neuropática, inflamação e fraqueza, sem alterar a própria condição. Tratamentos farmacológicos bem elaborados poderiam acelerar a taxa de regeneração, preservar a viabilidade dos neurônios e aprimorar a precisão axonal para os órgãos alvo. Os medicamentos eficazes precisam atuar em eventos específicos após uma lesão nervosa, e os avanços no entendimento das sequências moleculares e celulares após uma lesão podem auxiliar nisso. Alguns medicamentos e alvos nas vias de sinalização foram identificados, mas ainda existem desafios na aplicação clínica desses tratamentos (Rayner *et al.*, 2022).

### 1.10.1 Ácido valproico

O ácido valproico (VPA) foi sintetizado pela primeira vez em 1881 pelo químico americano Beverly S. Burton como solvente orgânico equivalente ao ácido valérico (Burton, 1882). Sendo amplamente utilizado como um solvente orgânico em indústrias de países ocidentais em meados do século passado, o ácido valproico começou a ser utilizado frequentemente pela indústria farmacêutica como solvente (Harris *et al.*, 2003).

Durante oito décadas, os laboratórios utilizaram o VPA com baixa frequência como solvente “metabolicamente inativo” para compostos orgânicos). No ano de 1962, Eynard e sua equipe estavam conduzindo pesquisas sobre substâncias derivadas da khelline (substância química encontrada na planta Ammi visnaga que tem sido estudada por suas propriedades medicinais, incluindo potenciais efeitos anticonvulsivos) com o objetivo de encontrar possíveis medicamentos anti-convulsivantes. No entanto, eles enfrentaram dificuldades ao tentar dissolver alguns desses derivados em água ou nos solventes orgânicos comumente utilizados. Meunier sugeriu então que esses compostos fossem dissolvidos em VPA. Os resultados obtidos pelos pesquisadores não evidenciaram nenhuma relação entre as diferentes doses do composto experimental e sua atividade anticonvulsivante (Meunier *et al.*, 1963). No entanto, mesmo diante dessa falta de correlação, a mistura ainda demonstrou possuir propriedades anti-convulsivantes. Carraz observou que as características anti-convulsivantes se originavam do VPA e a dosagem ajustada comprovou definitivamente essa constatação. No ano subsequente, foram registrados os primeiros estudos sobre epilepsia em seres humanos (Carraz *et al.*, 1964).

O VPA é um ácido graxo que possui uma natureza líquida, transparente e inodora, e se mantém líquido em temperaturas ambiente e corporal. Sua solubilidade é baixa em água, mas alta em solventes orgânicos (Henry, 2003). O VPA é um ácido carboxílico com cadeia ramificada simples, contendo oito carbonos, sendo  $C_8H_{16}O_2$  sua fórmula molecular e sua fórmula estrutural demonstrada na figura 12, apresentando as características de um ácido fraco ( $pK_a$  4,95) (Silva *et al.*, 2008).

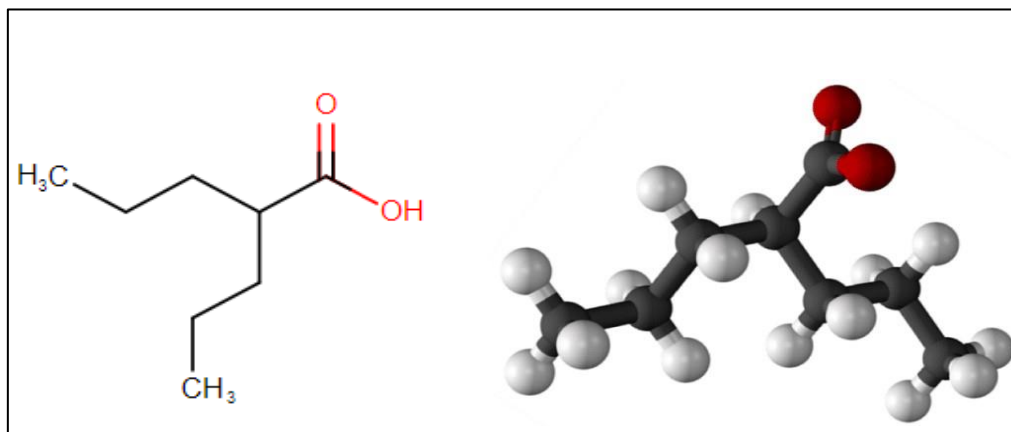


Figura 12: Fórmula estrutural plana do ácido valproico disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00313>. Acesso em: 21 nov. 2023 e em 3D disponível em: <https://acidos.info/valproico/>. Acesso em: 21 nov. 2023.

Segundo a *Food and Drug Administration* - FDA (2023), em 28 de fevereiro de 1978, o VPA recebeu aprovação com nome comercial de Depakene, e entrou na lista principal de medicamentos essenciais para cuidados básicos de saúde da Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo um dos medicamentos mais prescritos no mundo para tratar crises epiléticas (Perucca, 2002). Além de seus usos aprovados oficialmente pela FDA, o VPA também é usado em várias aplicações “*off label*” como episódios maníacos associados ao transtorno bipolar, profilaxia da enxaqueca, tratamento de emergência do estado de mal epilético, neuropatia periférica diabética, neuralgia pós-herpética e impulsividade, agressividade e agitação (Rahman, e Awosika, 2023).

#### 1.10.1.1 Farmacocinética

É de suma importância compreender a farmacocinética do VPA para entender como ele é absorvido, distribuído e metabolizado pelo organismo, sendo esse entendimento vital para apreender como o medicamento é impactado e afetado por variáveis como dosagens, formulações, consumo de alimentos, idade, gênero, peso corporal, função do fígado, polimorfismos genéticos e potenciais interações com outros medicamentos (Zaccara *et al.*, 1988).

O VPA é absorvido rapidamente após ser administrado oralmente (com uma biodisponibilidade superior a 80%). Embora sua velocidade de absorção no trato gastrointestinal e as variações nas concentrações plasmáticas possam ser influenciadas

pelo esquema de dosagem, pela formulação e pelas condições de uso, é pouco provável que a eficácia do VPA seja afetada (Silva *et al.*, 2008).

O VPA tem uma alta afinidade por proteínas plasmáticas e sua taxa de ligação diminui à medida que a concentração plasmática aumenta. Ele é predominantemente distribuído no fluido extracelular, e não permeia facilmente os tecidos, mas pode atravessar a barreira hematoencefálica e entrar no líquido cefalorraquidiano e na circulação fetal, respectivamente. Além disso, o VPA também pode atravessar a barreira placentária, podendo causar efeitos teratogênicos (Rahman e Awosika, 2023).

O fígado é o principal órgão que metaboliza o VPA, mas outros órgãos, como rins, pulmões e cérebro, também participam desse processo. Os rins possuem um sistema específico para processar e catabolizar produtos de conjugação do VPA formados no fígado. Embora outros órgãos tenham atividade menor, a expressão genética e a atividade das enzimas que metabolizam o VPA podem ser cruciais para o desenvolvimento de reações adversas a medicamentos. O metabolismo extra-hepático do VPA pode resultar em compostos semelhantes ou diferentes dos produtos hepáticos e, em alguns casos, pode ativar metabólitos do VPA formados no fígado (Shnayder *et al.*, 2023).

#### *1.10.1.2 Mecanismos de ação (farmacodinâmica)*

O VPA atua na inibição dos canais de sódio dependentes de voltagem e obstrui a entrada de íons de sódio nas células neuronais, o que resulta na redução da excitabilidade neural e da taxa de disparo dos neurônios. A ação do VPA também envolve a inibição da enzima GABA transaminase, responsável pela decomposição do GABA, o principal neurotransmissor inibitório no cérebro. Esse processo leva ao aumento dos níveis e da atividade do GABA, intensificando assim a inibição da função neuronal e, por conseguinte, diminuição da predisposição às convulsões. Em situações de dor neuropática, foi demonstrado que o VPA bloqueia a inflamação neurogênica através da inibição mediada pelo receptor GABA-A. Além disso, ele também promove a síntese de GABA ao aumentar a expressão e a atividade da ácido glutâmico descarboxilase (GAD), a enzima que transforma glutamato, o principal neurotransmissor excitatório no cérebro, em GABA. Tal processo contribui para a elevação dos níveis e da atividade do GABA.



O VPA regula a atividade de diversos canais de cálcio, incluindo os do tipo T, L e N. Esses canais são fundamentais na sinalização neuronal, liberação de neurotransmissores, expressão gênica e sobrevivência celular. Outros estudos sugerem que o VPA aumenta os canais de cálcio do tipo L, que estão envolvidos na plasticidade neuronal e na neuroproteção. O VPA também pode afetar os canais de cálcio do tipo N associados à dor neuropática e à enxaqueca (Rahman, 2023).

### *1.10.1.3 Ácido valproico na regeneração do sistema nervoso periférico*

O VPA pode estimular o crescimento de neuritos e promover a regeneração axonal em algumas condições neurológicas, podendo também retardar a apoptose em neurônios que estão degenerando. O VPA protege neurônios de excitotoxicidade induzida por glutamato e lesão por privação de oxigênio e estresse oxidativo (Bierman *et al.*, 2010; Göttlicher *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2017). Em pesquisas realizadas em ratos que tiveram seus nervos isquiáticos transecionados, e que logo após foram tratados com VPA por via oral, os resultados obtidos foram que o mesmo também pode facilitar a regeneração e a reabilitação da função motora (Wu *et al.*, 2008).

Em uma concentração terapêutica clinicamente relevante, o VPA produz efeitos semelhantes aos de fatores neurotróficos, como promoção do crescimento e sobrevivência dos neurônios.

O tratamento com VPA foi correlacionado com uma redução considerável na expressão de pNF $\kappa$ B e na liberação de citocinas pró-inflamatórias no nervo isquiático, gânglios da raiz dorsal e medula espinhal em um estudo realizado por Chen e colaboradores em 2018. Esse estudo indica que o VPA pode ser usado para inibir a inflamação e a dor neuropática resultante de lesões nos nervos periféricos. Nesta investigação, o VPA diminuiu a quantidade de proteínas inflamatórias (pNF $\kappa$ B, iNOS e COX-2), pró-apoptóticas (pAKT/AKT e pGSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$ ), citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e a imunorreatividade das proteínas COX-2 e pGSK-3 $\beta$ . Esses achados sugerem que o VPA pode atuar proteger contra a inflamação neurogênica e a morte de neurônios causadas por lesão nervosa e morte de células neuronais.

#### 1.10.1.4 Ácido valproico e histonas desacetilases

O ácido valproico funciona como um inibidor eficiente das histonas desacetilases (HDACs) (Figura 13) em concentrações que correspondem aos níveis normalmente utilizados na prática clínica (Tremolizzo *et al.*, 2005).

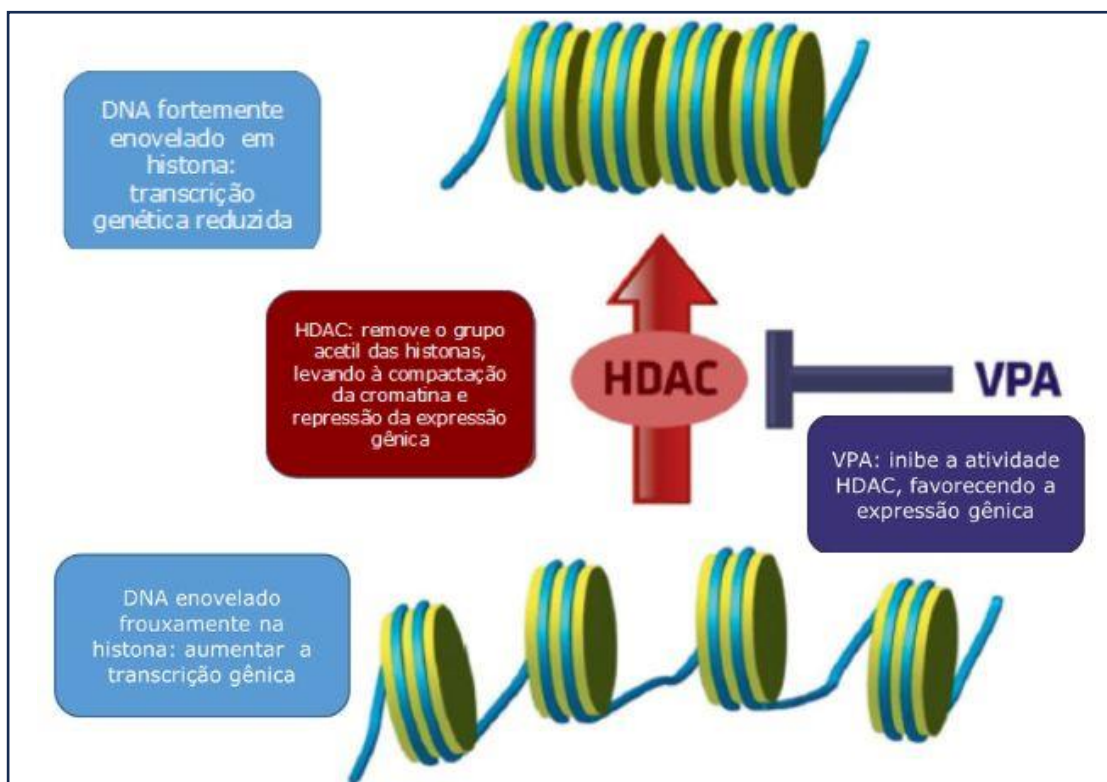


Figura 13: Inibição da HDAC pelo VPA. O ácido valproico agindo como um inibidor de HDAC, levando à transcrição gênica aprimorada. Adaptado de Bambini-Junior, 2014.

Quando ocorre a hiperacetilação dos resíduos de lisina nas histonas pela atividade histona acetiltransferase (HAT), o DNA se desenrola, permitindo o acoplamento de complexos transcripcionais e regulação positiva da expressão gênica. Entretanto, a relação desses efeitos transcripcionais com o efeito benéfico do VPA ainda não é completamente compreendida. Foi observado que a hiperacetilação de regiões regulatórias do gene BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) leva a um aumento na expressão do BDNF, contribuindo ainda mais para os efeitos neuroprotetores do VPA (Shnayder *et al.*, 2023), visto que o BDNF é uma proteína vital para a saúde e desenvolvimento do sistema nervoso. Este gene é responsável pela produção de uma proteína que promove a

sobrevivência de neurônios existentes, fomenta o crescimento e diferenciação de novos neurônios e a sinaptogênese (formação de conexões entre neurônios) (Brigadiski e Leßmann, 2020).

O ácido valproico atua principalmente na inibição das HDACs da Classe I (HDAC 1, 2, 3 e 8), que estão constitutivamente localizadas no núcleo. A histona H1 é uma proteína encontrada no cromossomo que tem função essencial na interação com o separador de DNA entre os nucleossomos, sendo crucial na construção da estrutura organizacional da cromatina. Essa ação resulta na regulação da expressão gênica, tendo impacto em processos biológicos diversos como a sobrevivência celular, regulação da transcrição, homeostase iônica e alterações do citoesqueleto. Além disso, o VPA demonstrou uma redução considerável na expressão de pNFκB e na liberação de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que poderia ser usado para inibir a inflamação e a dor neuropática (Nalivaeva et al., 2009).

### 1.11 JUSTIFICATIVA

Visto que a literatura mostra que os inibidores da atividade HDAC são imunomoduladores, a justificativa para esse trabalho é a necessidade de entender o potencial regenerativo do ácido valproico (VPA) como um inibidor de HDAC (iHDAC) após o esmagamento do nervo isquiático em camundongos. Isso pode contribuir para o avanço do conhecimento científico a respeito da regeneração nervosa periférica e potencialmente abrir portas para futuras aplicações clínicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial regenerativo do bloqueio da atividade HDAC, pelo uso do VPA, em modelo murino de lesão compressiva do nervo isquiático.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os aspectos morfológicos da regeneração dos nervos isquiáticos dos animais submetidos ao tratamento com VPA, após a cirurgia por esmagamento do nervo isquiático, através de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão;

- Avaliar a recuperação da função motora através do índice de função do isquiático (IFI), dos animais submetidos à lesão do nervo isquiático ao longo do tratamento, quantificar e analisar estatisticamente estes dados;

- Avaliar a recuperação da sensibilidade dolorosa utilizando o Teste da picada do alfinete (*pinprick*), dos animais ao longo do tratamento, quantificar e analisar estatisticamente estes dados;

- Verificar se a inibição da atividade HDAC altera a dinâmica das populações de monócitos e linfócitos CD11b/Ly6C gerados a partir da diferenciação mielóide no sangue periférico e peritônio através da citometria de fluxo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57/BL6 adultos jovens entre 8 e 10 semanas de idade, pesando entre 19 e 25 gramas. Este trabalho foi autorizado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ, protocolo n° 057/19, e todos os procedimentos estão de acordo com as recomendações do comitê de ética.

#### 3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos randomicamente em quatro grupos, de acordo com o tratamento administrado, em grupo Sham, grupo lesão sem tratamento, grupo lesão tratado com PBS e grupo lesão tratado com ácido valproico (Tabela 1).

<b>Nome do Grupo</b>	<b>Tratamento Proposto</b>	<b>Número de animais</b>
Sham	Exposição do nervo isquiático	N=8
Lesão	Esmagamento do nervo isquiático sem qualquer tipo de tratamento	N=8
PBS	Esmagamento do nervo isquiático + tratamento com PBS	N=8
VPA	Esmagamento do nervo isquiático + tratamento com VPA	N=8

Tabela 1: Grupos experimentais.

### 3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida foi feita a tricotomia do membro inferior direito, e logo após foi realizada uma incisão na face posterior do terço proximal da coxa para exposição do nervo isquiático, sem secção muscular, utilizando uma lâmina de bisturi nº 10. Uma vez exposto o nervo, foram mensurados 2 mm, tomando como referência a saída do nervo isquiático do forâmen isquiático maior, e realizado o esmagamento do nervo, utilizando uma pinça Dumont #5 (Fine Scientific Tools), abaixo da medida obtida, pelo período de 1 minuto (Figura 14). No grupo Sham, foi realizado o mesmo procedimento descrito acima, porém o nervo foi apenas exposto e não houve esmagamento desse nervo (Figura xB). Após os procedimentos cirúrgicos, a musculatura foi reposicionada sob o nervo e a pele suturada com monofilamento de nylon 6.0. Imediatamente após a cirurgia os animais foram mantidos aquecidos para a recuperação pós-anestésica. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com auxílio de uma lupa cirúrgica utilizada com aumento de 12 e 20 vezes (Opto FI04, SP, Brasil).

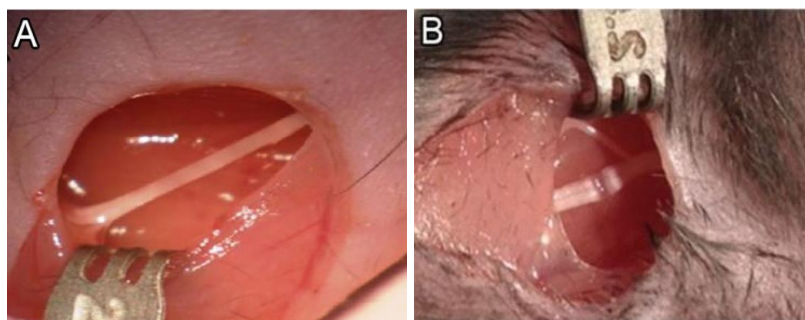


Figura 14: Imagem do procedimento cirúrgico. (A) Nervo isquiático exposto. (B) Nervo isquiático após esmagamento. Fonte: Cardoso *et al.*, 2019.

### 3.3 ADMINISTRAÇÃO DO TRATAMENTO

O grupo tratado com ácido valproico (Depakene, laboratório Abbott do Brasil<sup>®</sup>, 250mg) recebeu injeções intraperitoneais um dia após a cirurgia, e diariamente durante

14 dias seguidos, em uma dose de 300 mg/Kg (Chen *et al.*, 2018). O grupo tratado com PBS recebeu as injeções intraperitoneais seguindo o protocolo do grupo tratado com ácido valproico.

A escolha da via intraperitoneal para administração do tratamento se deve ao fato de mesma ser uma das vias de administração de substâncias mais comumente utilizada em estudos em roedores, na qual o agente é injetado na cavidade intraperitoneal do animal. Essa técnica além de ser minimamente estressante para os animais, é uma técnica fácil de ser realizada. A grande área de superfície e a presença de microvilosidades nas células mesoteliais além do vasto suprimento de sangue facilitam a rápida absorção de substâncias após a administração intraperitoneal. Adicionalmente, o transporte linfático de substratos contribui significativamente para a transferência total da cavidade peritoneal para a circulação sistêmica (Al Shoyaib *et al.*, 2020).

### 3.4 TESTES FUNCIONAIS

Foram realizados, em todos os grupos experimentais, avaliações sensitivas e motoras no período pós-cirúrgico, a fim de graduar o distúrbio sensitivo-motor e para avaliar a recuperação desses animais.

#### 3.4.1 Índice de função do isquiático (IFI)

Para análise da marcha dos animais, utilizamos o índice de função do isquiático (IFI), no qual os animais foram colocados em uma passarela revestida com papel Canson branco (A4 140 mg/m<sup>2</sup>) e as patas traseiras pintadas com tinta à base d'água e os mesmos caminharam livremente deixando a marcação das suas pegadas. As patas escolhidas para as medidas foram selecionadas em um ponto onde o camundongo andou em um passo moderado. Os animais caminharam até que obtivéssemos marcações mensuráveis (Inserra *et al.*, 1998). As análises foram feitas antes da cirurgia, 7,14 e 21 dias do pós-cirúrgico.

Para análise do IFI, medimos os parâmetros de abertura dos dedos, que compreende a distância entre o primeiro e o quinto dedo, e o comprimento da pegada, que compreende a distância entre o terceiro dedo e o coxim traseiro. Essas medidas foram obtidas tanto do lado experimental (lado operado), quanto do lado normal, e o IFI é calculado utilizando a fórmula proposta por Inserra e colaboradores (1998) (Figura15):

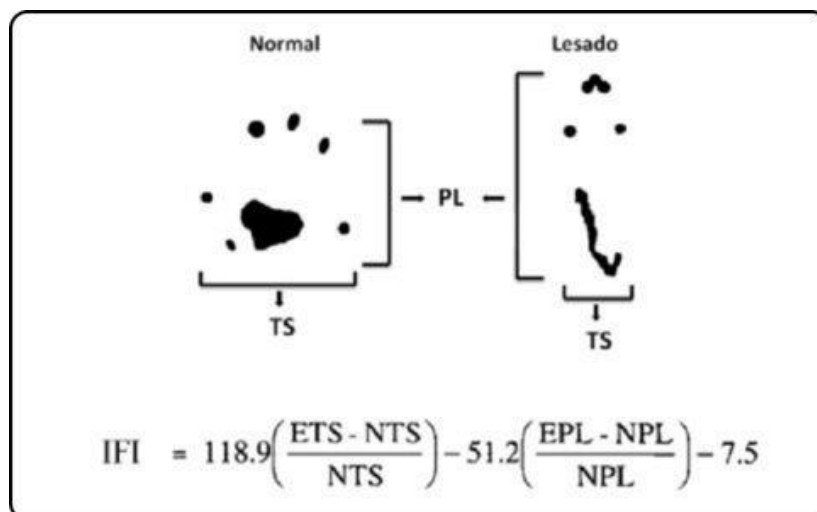


Figura 15: Imagem ilustrativa das pegadas do animal do lado normal (sem lesão) e do lado com lesão, exemplificando o comprimento da pegada (PL) e o espalhamento dos dedos (TS). Fórmula utilizada para obtenção do IFI: ETS= valor do espalhamento dos dedos do lado lesado; NTS= valor do espalhamento dos dedos do lado normal; EPL= valor do comprimento da pegada do lado lesado; NPL= valor do comprimento da pegada do lado normal.

### 3.4.2 Teste da picada do alfinete (Pinprick test)

Para analisar a recuperação da sensibilidade dolorosa após a lesão, utilizamos o pinprick test, no qual os animais são colocados em uma grade elevada e a parte lateral da superfície plantar é brevemente estimulada utilizando um alfinete entomológico. (DECOSTERD e WOOLF, 2000). Neste teste utilizamos alfinetes 000 de entomologia, por serem mais finos e estimularem preferencialmente receptores nociceptivos. Utilizamos na avaliação cinco áreas na parte lateral da superfície plantar traseira direita, na área de inervação pelo nervo isquiático, são elas: calcâneo, metatarso, porção medial do metatarso, metacarpo falangeana e falanges (Figura 16). Cada área foi testada duas vezes, e as respostas foram registradas como positivas apenas quando reações, como



retirada rápida da pata e vocalização, foram desencadeadas pela estimulação (NAVARRO, 2007). A análise foi realizada 7, 14 e 21 dias após a cirurgia.



Figura 16: Imagem ilustrativa do teste pinprick. (A) Representação esquemática da pata do animal nos 5 pontos que serão estimulados. (B) Agulha tocando um ponto na pata esquerda do animal através das frestas.

### 3.5 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Após o período de 14 dias os animais foram submetidos à anestesia e perfundidos por via intracardíaca com paraformaldeído a 4%. Depois da perfusão, os nervos isquiáticos dos animais foram dissecados e seccionados. Um segmento de 0,5mm (0,2mm após o sítio da lesão) foi retirado de cada nervo e imerso em uma solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,4. Posteriormente esses nervos foram processados para a microscopia óptica (Fig 10).

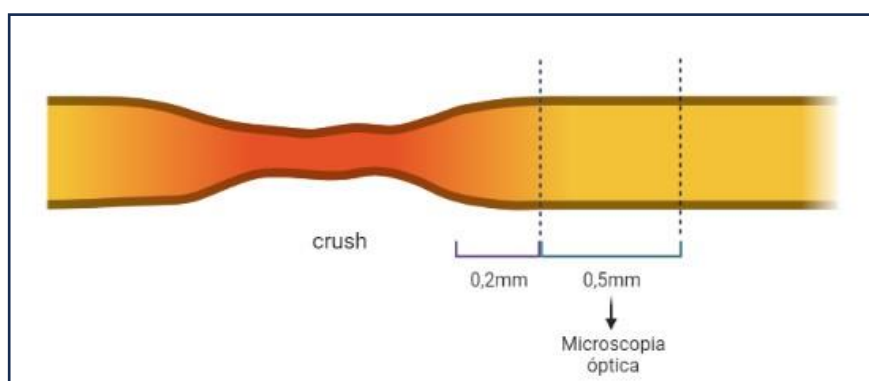


Figura 17: Imagem ilustrativa do segmento do nervo utilizado para as análises morfológicas (microscopia óptica). Autoria própria.

### 3.6 PROCESSAMENTO DO NERVO PARA CORTES SEMIFINOS

Após a pós fixação das porções dos nervos por imersão em glutaraldeído em tampão cacodilato, destinadas à microscopia óptica, seguiram-se as etapas seguintes:

**1º dia** – Como os nervos já haviam sido previamente fixados por imersão, os mesmos passaram por três lavagens consecutivas de um minuto com tampão cacodilato a 0,1molar (pH 7,4) e depois foram pós-fixados por 60 minutos em tetróxido de ósmio a 1%, contendo ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio 50nM em tampão cacodilato 0,1M (pH7,4), na ausência de luz, dentro da capela (essa etapa é denominada osmificação). Ao final desse tempo, os segmentos nervosos passaram por três lavagens de cinco minutos cada, e por fim, colocados em solução aquosa de acetato de uranila a 1%, na ausência de luz, durante toda a noite e em agitação.

**2º dia** – As amostras passaram por uma lavagem em água destilada por 5 minutos e logo em seguida foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona nas seguintes porcentagens, sucessivamente: 30%, 50%, 70%, 80%, 90% (duas lavagens de sete minutos em cada concentração) e 100% (duas lavagens de quinze minutos, cada uma). Imediatamente após a desidratação, o material foi infiltrado em uma mistura de 1:1 de acetona 100% e resina (*Poly/Bed*<sup>®</sup> 812, Polysciences), durante a noite, no agitador.

**3º dia** – Os espécimes foram infiltrados em resina 100% e mantidas por uma noite, em agitação.

**4º dia** – Por último, o material foi incluído em moldes específicos de silicone contendo resina 100% e levados à estufa por 48 horas em uma temperatura de 60°C, para a polimerização da resina.

Após a polimerização, os blocos de resina foram devidamente desbastados em uma forma trapezoidal para remover o excesso de resina e cortes transversais semifinos de 500nm de espessura foram obtidos utilizando ultramicrotomo (MT-6000-XL-RMC, Inc.), colocados em lâminas de vidro e corados em uma solução aquosa de azul de toluidina a 1% em água. Para serem analisados, os cortes semifinos foram fotografados através de um microscópio óptico (Zeiss Axioskop 2 plus), com o programa Axiovision Rel. 4.5, no aumento de 40x, no qual foram realizadas a contagem do número total de

fibras mielínicas e de vasos sanguíneos, e no aumento de 100x para avaliação da razão-G (G-ratio).

### 3.7 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Para a quantificação do número total de fibras mielínicas e vasos sanguíneos, foi utilizado o ramo tibial do nervo isquiático (n=6). Para a análise quantitativa da área da mielina, área do axônio, área da fibra nervosa e razão-G (G-ratio), os mesmos cortes semifinos foram fotografados em cinco campos diferentes (Figura 18). A partir das imagens obtidas, utilizamos o Image J (1.42q) para a quantificação dos parâmetros descritos a partir das imagens obtidas e testes estatísticos específicos para analisar cada condição.

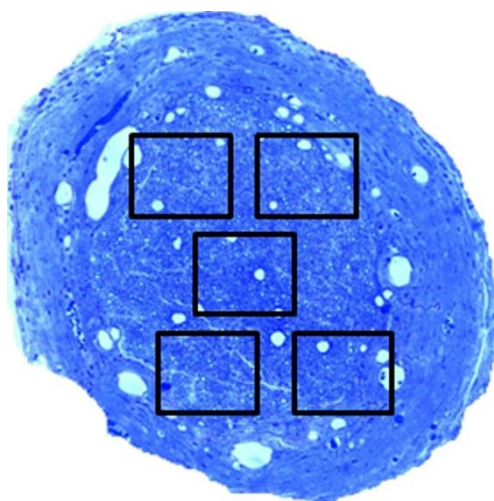


Figura 18: Imagem ilustrativa dos 5 campos fotografados em maior aumento de um nervo regenerado para a análise quantitativa do razão-G.

A razão-G é um parâmetro conhecido e comumente utilizado para determinar o grau de mielinização da fibra nervosa. Este parâmetro, que tem uma relação direta tanto com a espessura da mielina quanto com a velocidade de condução do impulso nervoso, é calculado a partir da razão entre o diâmetro do axônio ( $d$ ) e o diâmetro da fibra nervosa ( $D$ ) ( $d/D$ ) (Figura 19). Para o nervo isquiático, o valor ideal da razão-G fica entre 0,55 e 0,68 (Chomiak e Hu, 2009).

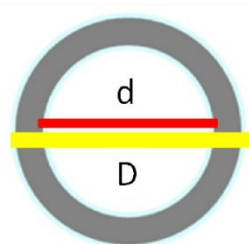


Figura 19: Representação esquemática da razão-G. Obtida por meio da divisão entre o diâmetro do axônio (d) e o diâmetro total da fibra nervosa (D).

### 3.8 CITOMETRIA DE FLUXO

No terceiro dia da cinética os animais de todos os grupos experimentais foram eutanasiados e as células do peritônio e do sangue periférico foram isoladas por centrifugação, ressuspensas em PBS e contadas na câmara de Neubauer. Para análise fenotípica, as suspensões celulares do peritônio e do sangue periféricos foram incubadas com anticorpo bloqueador Fc, produzido pelo clone 2.4G2 obtido no Banco de Celulas do Rio de Janeiro, por 10 min a 4°C. A suspensão de células foi lavada com PBS e incubada com os anticorpos monoclonais CD11b FITC (BD Bioscience, 553310), anti-Ly6C PE (BD Bioscience, 560592) e anti-Ly6G APC (Biolegend, 127613). As amostras foram analisadas a partir das células positivas 7AAD (BD Pharmingen, 559925), que identifica apenas as células viáveis. As análises foram feitas utilizando-se o citômetro FACS Aria II (BD Biosciences) a partir de um total de 100.000 eventos adquiridos para cada amostra através do *software* FlowJo.

### 3.9 Análises estatísticas

Todos os resultados obtidos foram analisados através do GraphPad Prism 8 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, Califórnia, USA) através do teste One Way Anova com pós teste

Tukey. Os valores foram apresentados como média e erro padrão. Foi aceito um intervalo de confiança de 95% ( $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISES FUNCIONAIS

#### 4.1.1 Pinprick

Para avaliar a eficácia da terapia com VPA na função dolorosa, utilizamos o *pinprick* (Figura 20). Na primeira semana o grupo VPA apresentou maior pontuação houve com diferença estatística significativa em relação aos grupos PBS e lesão. Já na segunda semana houve diferença estatística significativa com aumento da pontuação no grupo VPA comparado aos grupos PBS e lesão. Ao final do tempo de sobrevivência dos animais (21 dias) todos os grupos apresentaram a pontuação máxima.

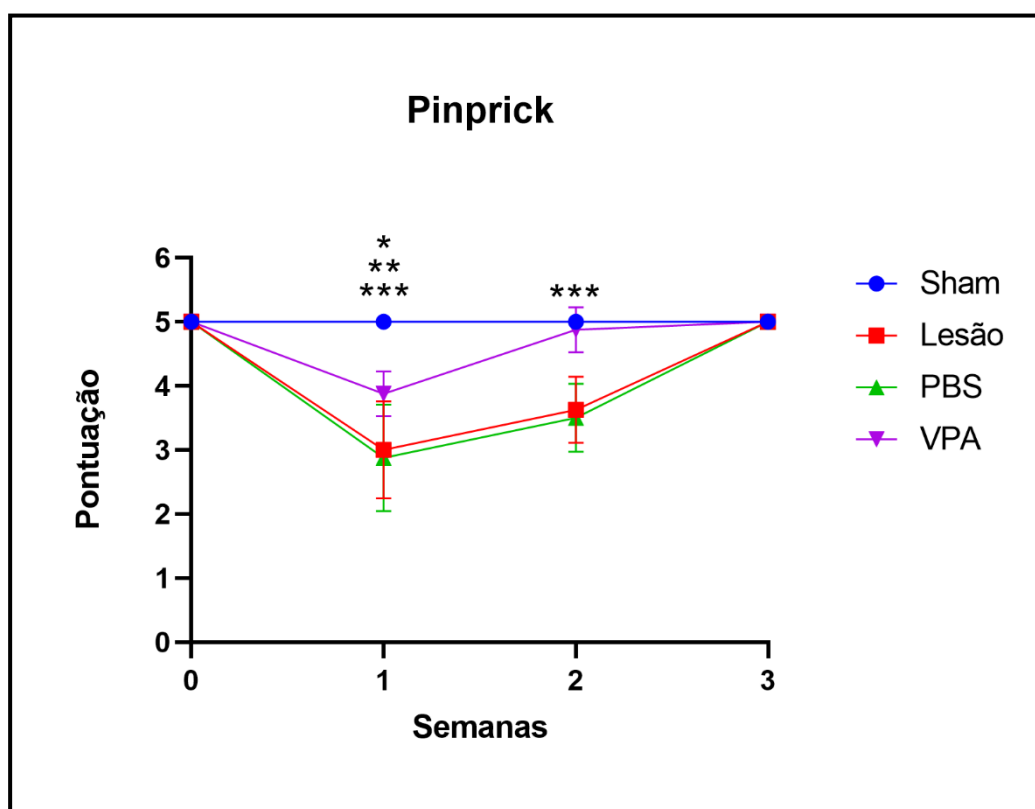


Figura 20: Análise funcional pelo teste pinprick. O gráfico mostra a variação do teste pinprick antes da lesão e nas três semanas após a lesão. (\*), (\*\*), (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Os valores foram representados em média e erro padrão da média (SEM).

#### 4.1.2 Índice de Função do Isquiático (IFI)

Na primeira semana após a cirurgia o Índice de Função do Isquiático mostrou melhora com diferença estatística significativa no grupo VPA em relação ao grupo sham. Na segunda semana pós-cirurgia, houve aumento com diferença significativa no grupo VPA comparado aos grupos PBS e lesão. Ao final das três semanas, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 21).

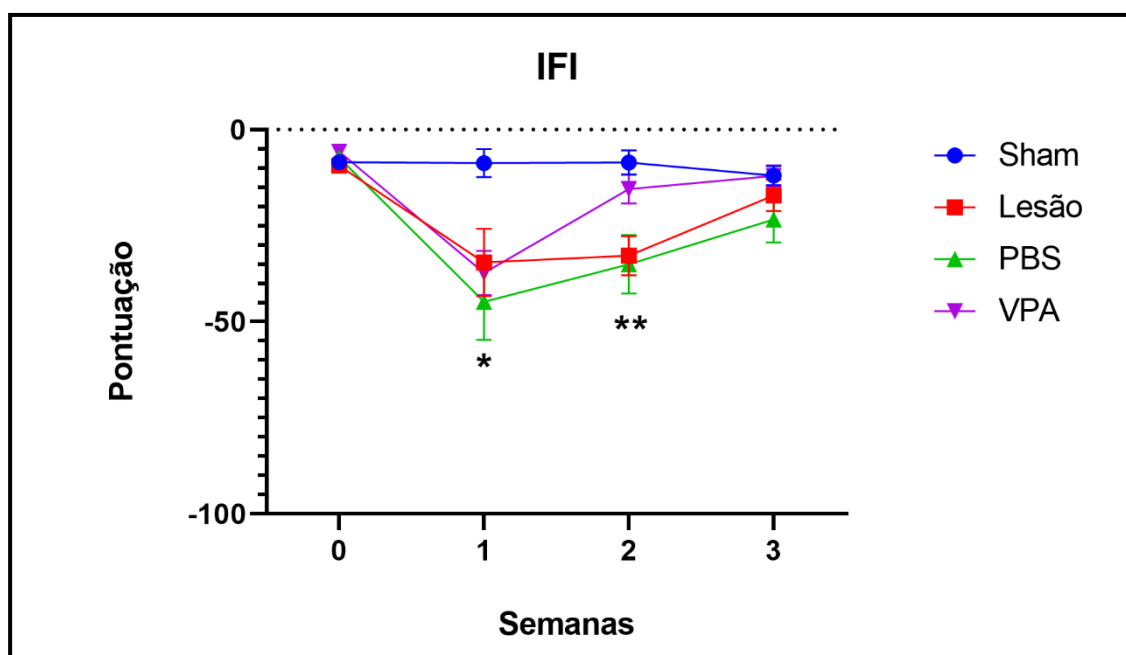


Figura 21 - Análise funcional pelo Índice de Função do Isquiático. (\*),(\*\*),  $p < 0,001$ . Os valores foram representados em média e erro padrão da média (SEM).

#### 4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO NERVO ISQUIÁTICO

A porção tibial dos nervos isquiáticos, processados após duas semanas de sobrevida ( $n=6$ ), foi utilizada para análise quantitativa e qualitativa do processo regenerativo. Na Figura 22, podemos observar, qualitativamente, nos cortes semi-finos que tanto o grupo lesão quanto o grupo PBS apresentam morfologia diferente do padrão normal evidenciado no grupo sham, que possui um número maior de fibras e um

microambiente mais organizado, o que também podemos ver no grupo VPA. Foram realizadas análises quantitativas para avaliar o número total de fibras mielínicas e de vasos sanguíneos presentes nos nervos.

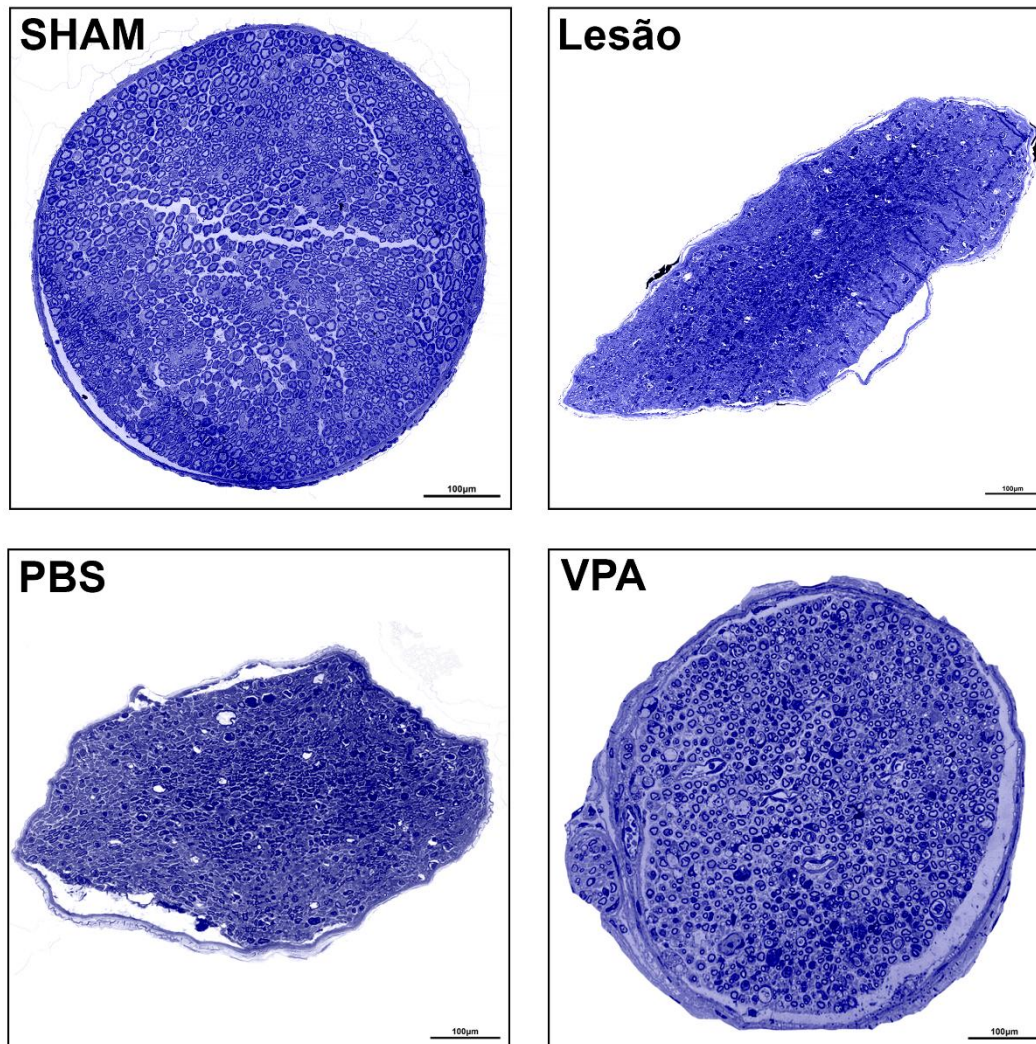


Figura 22: Cortes semifinos da porção tibial, distal à lesão.

A análise do número total de fibras mielínicas (Figura 23) mostrou aumento com diferença significativa no grupo VPA em relação aos grupos PBS e lesão.



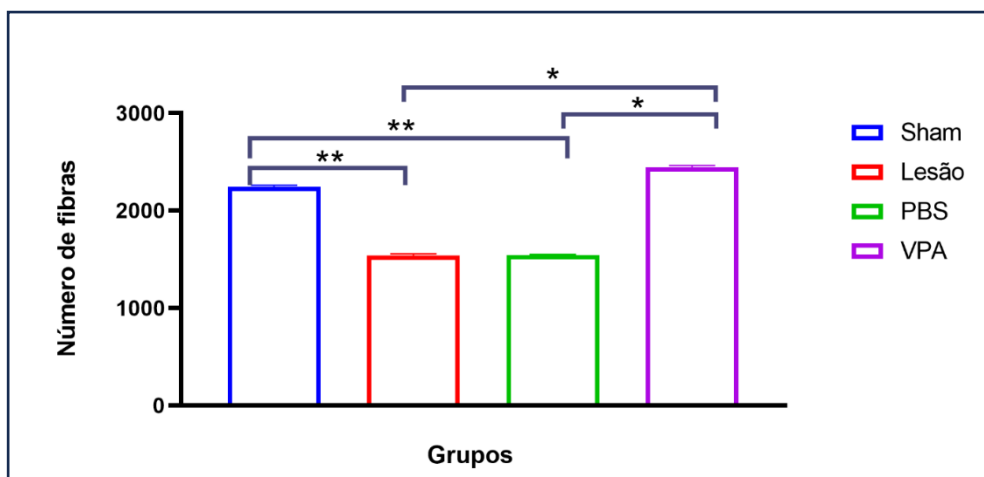


Figura 23: Análise qualitativa do número de fibras mielínicas nos cortes transversais semifinos. (\*), (\*\*),  $p < 0,001$ . Os valores foram representados em média e erro padrão da média (SEM).

A quantificação do número total de vasos sanguíneos nos nervos não evidenciou diferença significativa entre os grupos (figura 24).

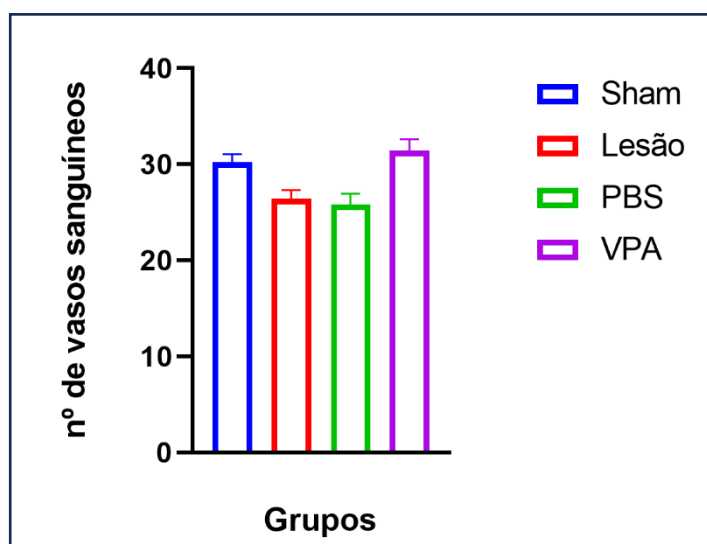


Figura 24: Análise quantitativa do número de vasos sanguíneos. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao número total de vasos sanguíneos. Os valores foram representados em média e erro padrão da média (SEM).

As análises morfológicas quantitativas em relação à área do axônio, área da fibra, área de mielina realizadas nos cortes semifinos do nervo isquiático em regeneração não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A razão-G não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos nas faixas 0,55 e 0,68 preconizada como a ideal por Chomiak (2009) (Figura 25). Houve diferença estatística significativa nas faixas 0,41 a 0,54 com diminuição do número de fibras mielínicas em relação ao grupo sham.

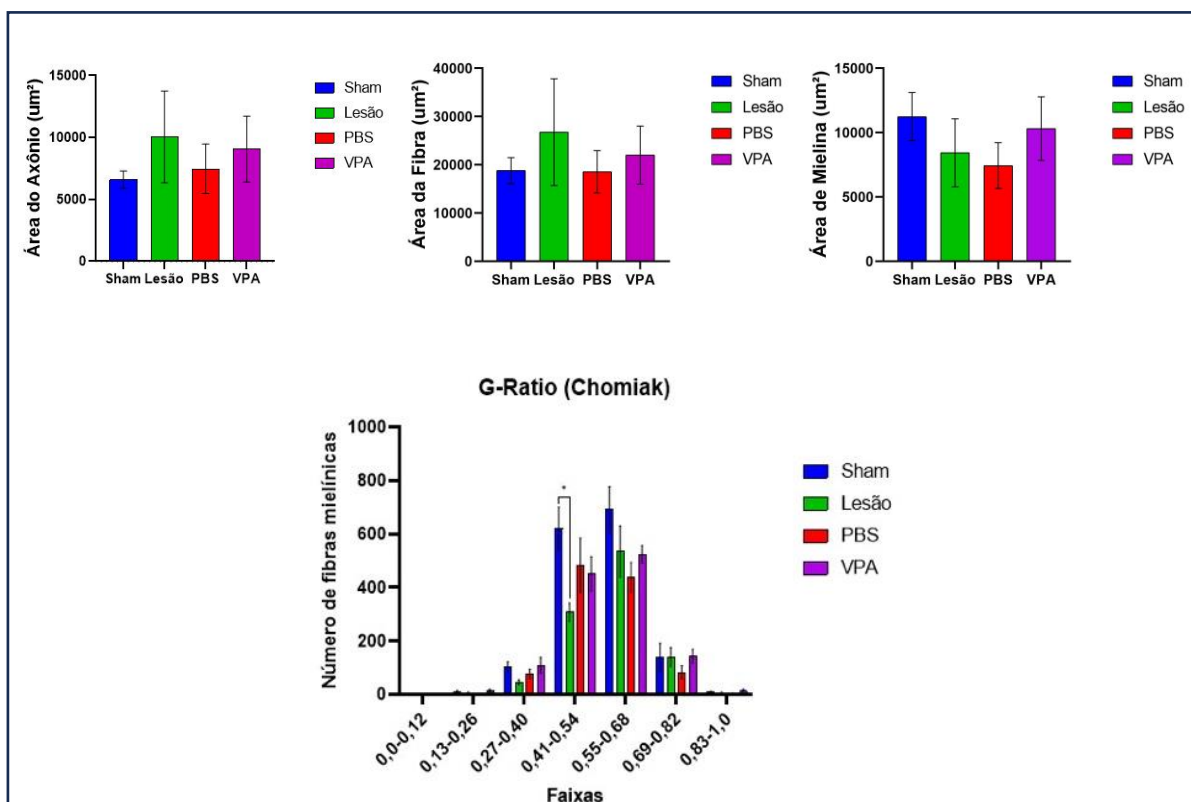


Figura 25: Análises morfológicas quantitativas da A) área do axônio, B) área da fibra, C) área da mielina e D) G-Ratio.. (\*)  $p < 0,001$ . Os valores foram representados em média e erro padrão da média (SEM).

#### 4.3 CITOMETRIA DE FLUXO

Foi realizada a caracterização da resposta imunológica aguda após esmagamento do nervo isquiático e tratamento com VPA por citometria de fluxo. No quarto dia após o esmagamento do nervo isquiático, e administração dos respectivos tratamentos, os camundongos foram sacrificados e as células totais da cavidade peritoneal foram coletadas para investigar o perfil de resposta imunológica induzido pelo tratamento com VPA. Foram utilizados anticorpos CD11b e Ly6G estudar a dinâmica de populações mieloides e quantificação total de células na cavidade peritoneal dos camundongos dos grupos sham e lesão, e dos camundongos tratados com PBS e com VPA. Os camundongos tratados com VPA apresentaram um aumento, com diferença estatística significativa, no número total da subpopulação de fenótipo  $CD11b^+/Ly6G^+$  (neutrófilos) quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 26).

Estes resultados indicam que o VPA apresenta uma capacidade imuno-modulatória da população de neutrófilos da cavidade peritoneal, com possível impacto sobre a recuperação funcional observada.

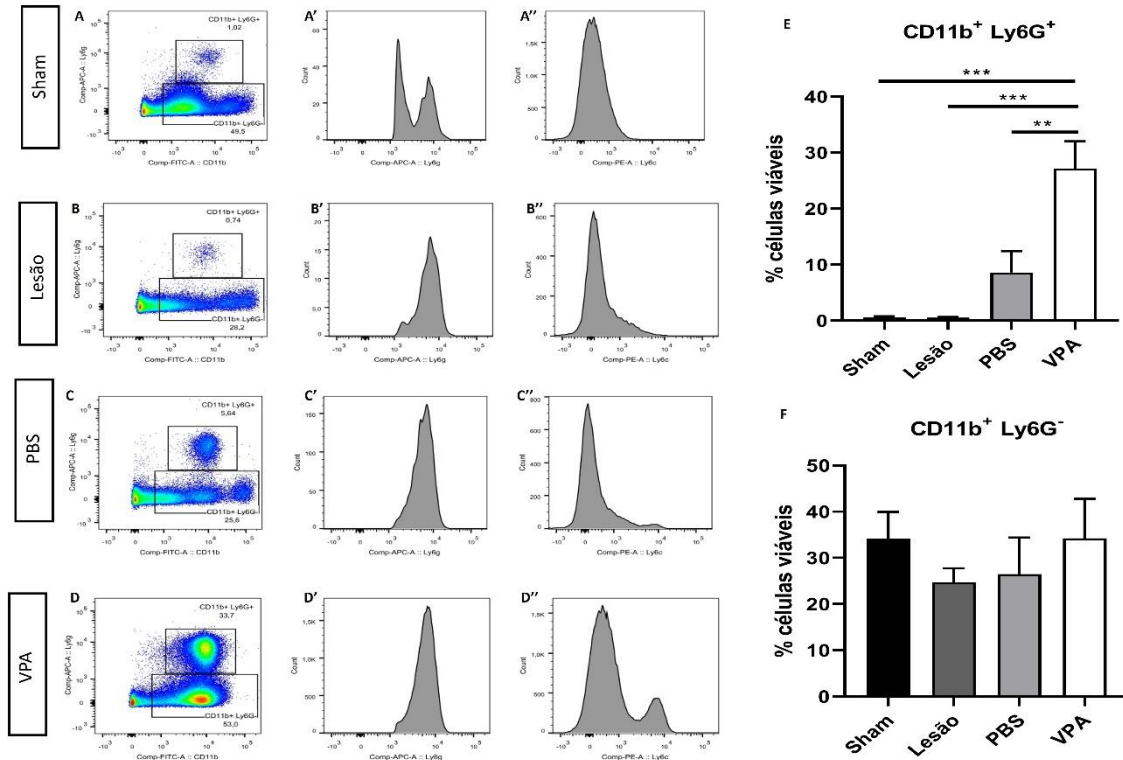


Figura 26: Caracterização da resposta imune aguda por citometria de fluxo em (A) sham, (B) lesão, (C) PBS ou (D) camundongos tratados com VPA. (E) O grupo tratado com VPA apresentou um aumento no número total do subconjunto celular CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) com diferença estatística significativa. (F) Em contraste, não houve aumento significativo no subconjunto celular CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>-</sup> (monócitos). \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. N=4.

## 5 DISCUSSÃO

As lesões de nervos periféricos podem ocorrer em cerca de 3% dos pacientes vítimas de trauma. Essas lesões variam tanto em gravidade como em complexidade, necessitando de diferentes abordagens e equipes multidisciplinares para o seu adequado tratamento. Essas lesões podem ter um impacto profundo na vida dos pacientes e geralmente estão relacionadas a uma morbidade considerável, podendo resultar em deficiências graves. Como costumam afetar jovens adultos na fase ativa da vida profissional, essas deficiências podem ter consequências duradouras para os pacientes. Identificar o momento da ocorrência de uma lesão é crucial para avaliar sua gravidade e determinar as estratégias de tratamento adequadas. O intervalo de tempo entre a lesão e o início da manifestação dos sintomas neurológicos pode fornecer indícios sobre a natureza da lesão - um surgimento tardio de sintomas pode indicar uma lesão compressiva, enquanto um início imediato após a lesão pode sugerir uma lesão diretamente no nervo periférico. O modo como a lesão ocorreu e a intensidade do trauma podem ajudar a avaliar a amplitude e a severidade da lesão nervosa. Essas informações são extremamente úteis para a tomada de decisões clínicas e a avaliação do possível prognóstico (Althagafi e Nadi, 2023).

Em um estudo de revisão de literatura, realizado por Yang e colaboradores (2021), os autores destacaram a importância da identificação precoce e do diagnóstico adequado dessas lesões, bem como a necessidade de uma abordagem individualizada no tratamento, considerando fatores como a gravidade da lesão e a localização anatômica para que a recuperação seja a mais bem sucedida possível.

As lesões traumáticas do sistema nervoso periférico (SNP) representam um desafio clínico significativo, podendo acarretar danos à função sensorial e motora dos pacientes. Essas lesões podem ser resultado de acidentes automobilísticos, traumas, quedas, lesões esportivas e ferimentos de guerra, iatrogenia, dentre outras causas. A restauração da função dos nervos periféricos danificados representa um desafio contínuo no âmbito da pesquisa básica e translacional. Apesar dos esforços consideráveis para melhorar as técnicas de reparo existentes e desenvolver novas abordagens, a porcentagem de pacientes que alcançam a recuperação funcional completa, e a extensão dessa

recuperação, não apresentou um aumento significativo em quase 70 anos (Foy *et al.*, 2022).

Os nervos periféricos são conduzidos para se regenerarem espontaneamente após a lesão (Duffy *et al.*, 2019), porém a reinervação é lenta já que os axônios crescem cerca de 1mm por dia, o que torna necessária a utilização de estratégias de tratamento que acelerem esse crescimento a fim de diminuir os danos causados por essa lesão.

Atualmente, não existem medicamentos específicos estabelecidos que auxiliem a regeneração do nervo periférico, o que reforça a importância de estudos experimentais na busca por medicamentos que possam acelerar o processo de regeneração dos tecidos nervosos periféricos, diminuindo as sequelas, provenientes de lesões nos nervos (Bota e Fodor, 2019). Essa relevância se dá não apenas em lesões compressivas, quando não há necessidade de intervenção cirúrgica, mas em lesões mais graves associando o uso de fármacos a outras terapias, como a tubulização e as novas terapias que vêm surgindo graças aos avanços da engenharia tecidual, que possam acelerar o processo de regeneração nervosa.

Nesse trabalho realizamos uma lesão por esmagamento no nervo isquiático com uma pinça com o objetivo de avaliar o potencial regenerativo do VPA em modelo experimental murino. O VPA, um medicamento anti-epilético também utilizado como estabilizador de humor mostrou efeitos benéficos na regeneração funcional e histológica do nevo isquiático de ratos (Rao *et al.*, 2014). O VPA é um inibidor da atividade HDAC, tendo como um de seus principais efeitos a neuroproteção, pois aumenta os níveis de GABA e a expressão de fatores neurotróficos como BDNF, contribuindo dessa forma para promover a regeneração de nervos lesionados (Shnayder *et al.*, 2022).

No presente estudo, utilizamos o teste do *pinprick* para avaliar a função dolorosa em diferentes grupos experimentais ao longo de três semanas. Nossos resultados apresentam evidências de que a terapia com VPA demonstra um efeito significativo na função dolorosa em comparação com os grupos controle. A diferença, estatisticamente significativa observada nas duas primeiras semanas após a lesão, sugere que o VPA pode atuar como um agente modulador da dor, proporcionando um alívio eficaz em relação à condição basal. Um estudo relevante que corrobora esses achados é o realizado por Chen e coautores (2018), no qual foi investigado o efeito do VPA na dor neuropática. Os resultados mostraram que o VPA foi capaz de reduzir a sensibilidade à dor neuropática em ratos através da inibição da excitabilidade neuronal. Outro estudo importante é o de

Choi e colaboradores (2019), que avaliou os efeitos do VPA em modelos animais de dor inflamatória. Os resultados indicaram que o VPA reduziu a dor causada pela inflamação através da modulação de vias de sinalização envolvidas na transmissão da dor. Outro estudo também mostrou que a dor neuropática foi reduzida após o uso de VPA devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores, além de conseguir regular as vias que sinalizam a inflamação no sistema (Guo *et al.*, 2021).

O índice de função do isquiático (IFI) é uma medida objetiva e quantitativa para avaliar a recuperação funcional após o reparo do nervo isquiático em modelos murinos e comprovou ser um marcador eficaz para avaliar a recuperação funcional após uma lesão e subsequente reparo do referido nervo. Ele tem sido amplamente utilizado em estudos experimentais e mostrou sensibilidade para detectar diferenças na função do nervo ao longo do tempo após a cirurgia (Inserra *et al.*, 1998).

Em nosso estudo foi observada uma diferença significativa no IFI na primeira semana pós-cirurgia entre os grupos VPA e os grupos controle. Isso sugere que o reparo do nervo isquiático afeta inicialmente a recuperação funcional nos grupos de interesse. Na segunda semana pós-cirurgia, houve diferenças significativas entre os grupos VPA e sham, indicando que o tratamento com VPA tem um papel importante na recuperação funcional. Nossos resultados sugerem que houve uma antecipação da melhora funcional motora no grupo VPA., corroborando com estudos realizados anteriormente que também demonstraram melhora da função motora no grupo tratado com VPA. Em modelos de transecção. (Wu *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2014)

A análise do número total de fibras mielínicas revelou aumento significativo no grupo tratado com VPA. Esses achados sugerem que o uso de VPA pode ter um efeito positivo na promoção do crescimento e desenvolvimento de fibras mielínicas. Estudos anteriores também relataram resultados semelhantes, mostrando que o VPA pode aumentar a mielinização e a formação de fibras mielínicas em modelos animais de lesão nervosa (Smith *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2020). Acredita-se que o VPA exerça seus efeitos por meio de várias vias, incluindo a o aumento da expressão de fatores de crescimento neural como BDNF (Zhang *et al.*, 2018)

Correlacionando o aumento do número de fibras mielínicas com a melhora da sensibilidade e da motricidade mostrada por nosso estudo, sugere-se que a mielinização influencia a recuperação funcional após uma lesão nervosa, (Modrak *et al.*, 2020).

A quantificação do número total de vasos sanguíneos nos nervos é uma importante medida para avaliar a angiogênese e o suprimento sanguíneo em tecidos específicos. No presente estudo em que o grupo tratado com VPA não apresentou diferença significativa em relação aos outros grupos, é possível inferir que esse fármaco não exerceu um efeito pronunciado na vascularização dos nervos nesse estudo específico. Kim e colaboradores (2001) observaram que a inibição da atividade HDACs bloqueia a angiogênese, e a superexpressão de HDAC se mostrou um sinal ativador para a angiogênese. O aumento da atividade de HDAC em condições de hipóxia sugere que a HDAC pode estar envolvida na angiogênese induzida por hipóxia. Já o VPA demonstrou ter efeito anti-angiogênico na sinalização mediada pelo óxido nítrico (NO). O VPA inibe a HDAC e reduz a expressão de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), que uma enzima encontrada em células endoteliais humanas que são responsáveis pela produção de óxido NO, prevenindo a inibição da angiogênese induzida pelo VPA (Michaelis *et al.*, 2004). Tais estudos podem explicar nossos resultados no qual não houve aumento significativo no número de vasos sanguíneos nos nervos tratados com VPA.

Os resultados obtidos através da citometria de fluxo, para a caracterização da resposta imunológica inata, mostraram um aumento com diferença estatística significativa no número total da subpopulação de leucócitos de fenótipo CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) nas células da cavidade peritoneal em comparação com os outros grupos do experimento. Em uma busca refinada na literatura, não foram encontrados dados que corroborassem nossos resultados em lesões de nervos periféricos. De maneira interessante, Sas e colaboradores (2020) caracterizaram um subconjunto singular de CD14<sup>+</sup>/Ly6G<sup>low</sup> (células pró-regenerativas) e suas funções biológicas após a realização de uma lesão por esmagamento no nervo óptico de camundongos, seguida por uma injeção de zymosan (um composto derivado de levedura que induz a inflamação). Esse estudo é relevante, pois identifica um novo grupo de neutrófilos que estimulam a sobrevivência dos neurônios do sistema nervoso central e a restauração dos axônios. Este subconjunto poderia ser o alvo de intervenções terapêuticas para aprimorar os desfechos neurológicos em indivíduos com lesões no sistema nervoso central. Um estudo realizado por Benowitz e colaboradores (2017), mostrou que algum grau de regeneração foi alcançado através do próprio nervo óptico por fatores associados à inflamação intraocular, a oncomodulina (Ocm), que é uma proteína de ligação ao Ca<sup>(2+)</sup> secretada por uma

linhagem celular de macrófagos, que é um potente fator promotor de axônios para células ganglionares da retina.

A caracterização de neutrófilos modulados por Zymosan com propriedades neuroregenerativas proporciona uma visão sobre a heterogeneidade dos neutrófilos e os subgrupos únicos que podem ser identificados em diferentes contextos (Jerome *et al*, 2022). Relatos recentes revelam uma nova subcategoria de neutrófilos imaturos com capacidades neuroprotetoras e regenerativas, que podem ser um alvo potencial para o tratamento de lesões traumáticas no nervo óptico ou na medula espinal. Balog e colaboradores (2023) realizaram um estudo dos neutrófilos em danos e doenças dos sistemas nervoso central e periférico e relataram a presença dos mesmos no sistema nervoso periférico em resposta a lesões teciduais. Ele também menciona que a subpopulação CD14<sup>hi</sup> de neutrófilos melhorou a regeneração axonal em lesões nos sistemas nervoso central e periférico, apoiando a ideia de que os neutrófilos têm efeito benéfico nessas lesões. No entanto, o estudo não aborda ou discute o papel de outras células imunes, como as células CD11 ou CD14, no sistema nervoso periférico.

Os achados deste estudo indicam que o VPA é um tratamento potencialmente eficaz para lesões de nervos periféricos. O tratamento com VPA mostrou impactos positivos no controle da dor, na recuperação funcional e na mielinização. Contudo, o aumento significativo de neutrófilos CD11b+/Ly6G+ na cavidade peritoneal do grupo que recebeu VPA é um resultado surpreendente que necessita de mais pesquisas. Pode ser que esses neutrófilos desempenhem um papel positivo na regeneração nervosa, conforme sugerido por pesquisas recentes. Mais estudos são necessários para entender o papel dos neutrófilos na regeneração nervosa após uma lesão de nervos periféricos.



## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados que obtivemos em nosso estudo que utilizou o VPA como tratamento para lesões de nervo isquiático, podemos chegar às seguintes conclusões:

- O VPA mostrou uma melhora significativa na sensibilidade dolorosa e também na função motora ao longo do tratamento;
- A análise quantitativa dos cortes semi-finos dos nervos isquiáticos evidenciou que o grupo tratado com VPA apresentou uma morfologia mais próxima do padrão normal (grupo Sham), com um microambiente mais organizado e, ao analisar quantitativamente esses nervos, vimos um aumento significativo do número de fibras mielínicas, o que sugere uma aceleração no processo de regeneração;
- A caracterização da resposta imune aguda revelou que o tratamento com VPA resultou em um aumento estatisticamente significativo no número total de neutrófilos (células CD11b+/Ly6G+) na cavidade peritoneal, em comparação com os outros grupos. Concluímos que a terapia epigenética usando VPA após uma lesão no nervo isquiático apresenta características imuno-modulatórias, com grande potencial regenerativo.

Portanto, essas conclusões sugerem que a terapia com VPA pode ter um efeito positivo na função da dor e no processo de regeneração do nervo isquiático, possivelmente por meio da modulação da resposta imune aguda. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar esses resultados e entender melhor os mecanismos envolvidos.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; PILLAI, Shiv; LICHTMAN, Andrew H.. **Imunologia celular e molecular**. 9 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023, 565 p.
- AL SHOYAIB, A.; ARCHIE, S. R.; KARAMYAN, V. T. Intraperitoneal route of drug administration: Should it be used in experimental animal studies? **Pharmaceutical research**, v. 37, n. 1, 2020.
- ALTHAGAFI, A.; NADI, M. Acute Nerve Injury. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2023 Jan-. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31751038/>>. Acesso em: 12/12/2023.
- BALOG, B. M.; SONTI, A.; ZIGMOND, R. E. Neutrophil biology in injuries and diseases of the central and peripheral nervous systems. **Progress in neurobiology**, v. 228, n. 102488, p. 102488, 2023.
- BAMBINI-JUNIOR, V. et al. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. **Brain research**, v. 1408, p. 8–16, 2011.
- BATISTA, K. T.; ALMEIDA, C. E. F. Epidemiologia das lesões traumáticas tardias de nervo periférico do membro superior. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 23, n. 1, p. 26-30, 2008.
- BENOWITZ, L. I.; HE, Z.; GOLDBERG, J. L. Reaching the brain: Advances in optic nerve regeneration. **Experimental neurology**, v. 287, p. 365–373, 2017.
- BIERMANN, J., GRIESHABER, P., GOEBEL, U., MARTIN, G., THANOS, S., GIOVANNI, S.D., LAGRÈZE, W. A., 2010. Valproic acid-mediated neuroprotection and regeneration in injured retinal ganglion cells. **Retinal Cell Biology**. 51, 526-534.
- BRIGADSKI, T.; LESSMANN, V. The physiology of regulated BDNF release. **Cell and tissue research**, v. 382, n. 1, p. 15–45, 2020.
- BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgical focus**, v. 16, n. 5, p. 1-7, 2004.
- BURTON, B. S. On the propyl derivatives and decomposition products of ethyl acetate. **American Chemical Journal**, v. 3, p. 389-395, 1882.
- BUSTIN, M. et al. The dynamics of histone H1 function in chromatin. **Molecular Cell**, v. 17, n. 5, p. 617-620, mar. 2005.
- CAMPOS, E. I.; REINBERG, D. Histones: Annotating Chromatin. **Annual Review of Genetics**, v. 43, n. 1, p. 559-599, dez. 2009.

CARDOSO, S. S. F. et al. Inosine accelerates the regeneration and anticipates the functional recovery after sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 423, p. 206–215, 2019.

CARRAZ, G.; FAU, R.; CHATEAU, R.; BONNIN, J. First clinical trials of the antiepileptic activity of n-dipropylacetic acid. **Ann Med Psychol (Paris)**, v. 122, p. 577–84, 1964.

CATALA, M.; KUBIS, N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. In: (Ed.). **Handbook of clinical neurology**: Elsevier, v.115, 2013.

CHEN, J.-Y. et al. Valproate reduces neuroinflammation and neuronal death in a rat chronic constriction injury model. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, 2018.

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**, v. 4, n. 11, p. e7754, 2009.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149–158, 2000.

DUFFY, P. et al. Synthetic bioresorbable poly- $\alpha$ -hydroxyesters as peripheral nerve guidance conduits; a review of material properties, design strategies and their efficacy to date. **Biomaterials science**, v. 7, n. 12, p. 4912–4943, 2019.

GEUNA, S., RAIMONDO, S., RONCHI, G., SCIPIO, F. D., TOS, P., CZAJA, K., FORNARO, M., 2009. Histology of Peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. **International Review of Neurobiology**. 87, 27–46. 19

FOY, C.; OLIVELLA, G.; KUFFLER, D. Prospects for Improving the Extent of Recovery following Peripheral Nerve Trauma: A Review. **P R Health Sci J.**, v. 41, n. 2, p. 89-95, 2022.

GLADKOVA, M. G.; LEIDMAA, E.; ANDERZHANOVA, E. A. Epidrugs in the therapy of central nervous system disorders: A way to drive on? **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 11, p. 1464, 2023.

GÖTTLICHER, M. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. **The EMBO journal**, v. 20, n. 24, p. 6969–6978, 2001.

GOULART, C. O., JÜRGENSEN, S., SOUTO, A., OLIVEIRA, J. T., LIMA, S. D., TONDA-TURO, C., MARQUES, S. A., ALMEIDA, F. M., MARTINEZ, A. M. B., 2014. A combination of Schwann-Cell Grafts and Aerobic Exercise Enhances Sciatic Nerve Regeneration. **Plus one**. 9,e110090.

GUO, A. et al. Valproic acid mitigates spinal nerve ligation-induced neuropathic pain in rats by modulating microglial function and inhibiting neuroinflammatory response. **International immunopharmacology**, v. 92, n. 107332, p. 107332, 2021.

HAN, H. et al. Discussion on structure classification and regulation function of histone deacetylase and their inhibitor. **Chemical biology & drug design**, 2023.

HAPPEL, N.; DOENECKE, D. Histone H1 and Its Isoforms: Contribution to Chromatin Structure and Function. **Gene**, v. 431, n. 1–2, p. 1–12, fev. 2009.

HARRIS, M. et al. Mood-stabilizers: the archeology of the concept. **Bipolar disorders**, v. 5, n. 6, p. 446–452, 2003.

HENRY, T. R. The history of valproate in clinical neuroscience. **Psychopharmacol Bulletin**, v. 37, n. 2, p. 5-16, 2003.

INGERSOLL, M. A. et al. Comparison of gene expression profiles between hman and mouse monocyte subsets. **Blood**, v. 115, n. 3, p. e10–e19, 2010.

INSERRA, M. M.; BLOCH, D. A.; TERRIS, D. J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery**, v. 18, n. 2, p. 119-124, 1998.

JEROME, A. D. et al. Characterization of Zymosan-Modulated Neutrophils With Neuroregenerative Properties. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves: Repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 13, p. 3521–3531, 1 jul. 2016.

JUNQUEIRA, L. C. U., & CARNEIRO, J. (2018). **Histologia básica** (13a ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

KHALED, M. M. et al. Regenerative strategies in treatment of peripheral nerve injuries in different animal models. **Tissue engineering and regenerative medicine**, v. 20, n. 6, p. 839–877, 2023.

KHALIFEH, B. Tissue Engineering in Injured Facial Nerve: A Narrative Review. **Journal of Neuroscience Research and Alzheimer's Disease**, v1, set. 2022.

KIM, M. S. et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. **Nature medicine**, v. 7, n. 4, p. 437–443, 2001.

KING, J.; PATEL, M.; CHANDRASEKARAN, S. Metabolism, HDACs, and HDAC inhibitors: A systems biology perspective. **Metabolites**, v. 11, n. 11, p. 792, 2021.

KONG, Q.-J. et al. Neuroprotective effects of valproic acid in a rat model of cauda equina injury. **World neurosurgery**, v. 108, p. 128–136, 2017.

KUMAR, Vinay; ASTER, Jon C.; ABBAS, Abul K.. **Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. 9 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023, 1421 p.

LACKINGTON, W. A.; RYAN, A. J.; O'BRIEN, F. J. Advances in nerve guidance conduit-based therapeutics for peripheral nerve repair. **ACS biomaterials science & engineering**, v. 3, n. 7, p. 1221–1235, 2017.

LI, Y.-H. et al. Occurrences and functions of Ly6Chi and Ly6Clo macrophages in health and disease. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.

LIN, S. L. et al. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. **The journal of immunology**, v. 183, n. 10, p. 6733–6743, 2009.

LAVORATO, A. et al. Traumatic peripheral nerve injuries: a classification proposal. **Journal of orthopaedics and traumatology: official journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology**, v. 24, n. 1, 2023.

LONDONO, R. et al. Tissue repair and epimorphic regeneration: An overview. **Current pathobiology reports**, v. 6, n. 1, p. 61–69, 2018.

MAIA, Maria de Mascena Diniz; SILVA, Isaura Isabelle Fonseca Gomes da. Conceitos básicos de epigenética para universitários. 1. ed. Recife: EDUFRPE, 2020.

MARKS, P. A. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 19, n. 9, p. 1049–1066, 2010.

MAOLANON, A. R.; MADSEN, A. S.; OLSEN, C. A. Innovative strategies for selective inhibition of histone deacetylases. **Cell chemical biology**, v. 23, n. 7, p. 759–768, 2016.

MARTINEZ, A. M. B., CORREA, E. M., & ALLODI, S. (2014). **Neuro-histologia: uma abordagem celular e sistêmica**. (1a ed.). Rio de Janeiro: Rubio.

MARTINEZ, A.M.B.; ALLODI, S.; UZIEL, D. **Neuroanatomia essencial**. Editora Guanabara Kogan, 1.ed. Rio de Janeiro, 2014.

MEUNIER, H.; CARRAZ, G.; MEUNIER, Y.; EYMARD, P.; AIMARD, M. Propntts pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacttique. **Therapie**, v. 18, p.435-438, 1963.

MICHAELIS, M. et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Molecular pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 520–527, 2004.

NAHRENDORF, M. et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. **The journal of experimental medicine**, v. 204, n. 12, p. 3037–3047, 2007.

NALIVAEVA, N. N.; BELYAEV, N. D.; TURNER, A. J. Sodium valproate: an old drug with new roles. **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 10, p. 509–514, 2009.

NAVARRO, X., VIVÓ, M. VALERO-CABRÉ, A., 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Progress in neurobiology**, 82, 163-201.

ISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **International immunology**, v. 30, n. 11, p. 511–528, 2018.

OLIVEIRA, J. et al. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit enhance median-nerve regeneration, prevent decrease of creatine phosphokinase levels in muscle, and improve functional recovery in mice. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1295-1303, 2010.

PERUCCA, E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: A summary after 35 years of clinical experience. **CNS drugs**, v. 16, n. 10, p. 695–714, 2002.

PESTANA, F. M., DOMINGUES, R. C. C., OLIVEIRA, J. T., DURÇO, D. F. P. A., GOULART, C. O., MENDONÇA, H. R., SANTOS, A. C. R. D., CAMPOS, T. N. D., SILVA, B. T. D., PEREIRA, C. C., BORGES, C. P., MARTINEZ, A. M. B., 2018. Comparison of morphological and functional outcomes of mouse sciatic nerve repair with three biodegradable polymer conduits containing poly (lactic acid). **Neural Regeneration Research**. 13, 1811-1819. 20

RAYNER, M. L. D.; HEALY, J.; PHILLIPS, J. B. Repurposing small molecules to target PPAR- $\gamma$  as new therapies for peripheral nerve injuries. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 1301, 2021.

RAHMAN, M; AWOSIKA, A. O.; NGUYEN, H. Valproic Acid. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2023 ago. 17. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32644538/>>. Acesso em: 12/12/2023.

RAMACHANDRAN, P. et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 46, 2012.

RAO, T. et al. Effects of valproic Acid on axonal regeneration and recovery of motor function after peripheral nerve injury in the rat. **Arch Bone Jt Surg**, v. 2, n. 1, p. 17-24, Mar. 2014.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European surgical research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RUIJTER, A. J. M. D.; GENNIP, A. H. V.; CARON, H. N.; KEMP, S.; KUILENBURG, A. B. P. V. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 737–749, 2003.

SANNINO, A.; MADAGHIELE, M.; CARROZZO, M.; SALVATORE, L.; AMBROSIO, L. **Nerve Tissue Engineering**. In: COMPREHENSIVE BIOMATERIALS, 5. 2011. p. 435-453.

SAS, A. R. et al. A new neutrophil subset promotes CNS neuron survival and axon regeneration. **Nature immunology**, v. 21, n. 12, p. 1496–1505, 2020.

SEDDON H. J., 1942. A classification of nerve injuries. **British Medical Journal**. 2, 237-239

SHNAYDER, N. A. et al. Therapeutic and toxic effects of valproic acid metabolites. **Metabolites**, v. 13, n. 1, p. 134, 2023.

SHUKLA, S.; TEKWANI, B. L. Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, 2020.

SILVA, M. F. B. et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 31, n. 2, p. 205–216, 2008.

SMITH, B. W. et al. An update on the management of adult traumatic nerve injuries—replacing old paradigms: A review. **The journal of trauma and acute care surgery**, v. 86, n. 2, p. 299–306, 2019.

SUNDERLAND, S., 1951. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain J Neurol**. 74,491-516.

TORTORA, Gerard J.. **Principios de anatomia e fisiologia**. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019, 1201 p.

TREMOLIZZO, L. et al. Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 5, p. 500–509, 2005.

VIJAYAVENKATARAMAN, S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. **Acta biomaterialia**, v. 106, p. 54–69, 2020.

WADDINGTON, C. H. An Introduction to Modern Genetics. Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, **General Entomology**, v. 14, n. 4–6, p. 82–82, jun. 1939

WADDINGTON, C. H. **The epigenetic landscape proposed** by C. H. Waddington (1940) in *Organisers & genes*. Cambridge: Cambridge University Press, 1940.

WANG, J. T.; MEDRESS, Z. A.; BARRES, B. A. Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. **The Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 1, p. 7–18, 9 jan. 2012.

WANG, M. L. et al. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. **Connective tissue research**, v. 60, n. 1, p. 3–9, 2019.

WEN, Y. et al. Macrophage heterogeneity in kidney injury and fibrosis. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.

WU, F. et al. Enhanced rat sciatic nerve regeneration through silicon tubes implanted with valproic acid. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 24, n. 04, p. 267–276, 2008.

YU, B. et al. Dynamics of Ionic Interactions at Protein–Nucleic Acid Interfaces. **Accounts of Chemical Research**, v. 53, n. 9, p. 1802-1810, set. 2020.

ZACCARA, G.; MESSORI, A.; MORONI, F. Clinical pharmacokinetics of valproic acid - 1988. **Clinical pharmacokinetics**, v. 15, n. 6, p. 367–389, 1988.

ZAIDI, S. et al. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. **Nature**, v. 498, p. 220–223, 2013.

ZHAO, S.; ALLIS, C. D.; WANG, G. G. The language of chromatin modification in human cancers. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, p. 413-430, 2021.

ZHANG, L. et al. Valproic acid promotes survival of facial motor neurons in adult rats after facial nerve transection: A pilot study. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 64, n. 4, p. 512–522, 2018.