

LESÃO MEDULAR TRATADA COM MEMBRANA AMNIÓTICA: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

**Leonardo Borges de Lima, Elisa Polifke Trindade, Rodrigo Álvaro Brandão
Lopes Martins, Eduarda César da Luz, Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa,
Luciana Barros Sant'Anna.**

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi,
2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil,
leonardolima1458@gmail.com, elisapolifke@yahoo.com

Resumo

A lesão medular (LM) apresenta grande complexidade e compromete a medula espinhal (ME), responsável por executar funções vitais do organismo. Após a LM inicia-se um processo inflamatório local que induz a formação de cicatriz glial. Atualmente, o tratamento da LM é pouco eficiente e apresenta grandes limitações, gerando sequelas graves e irreversíveis. Este estudo objetivou identificar, por imuno-histoquímica, a eficácia do tratamento com membrana amniótica humana na expressão de astrócitos, células associadas à cicatriz glial. Foram utilizados 15 ratos machos, 60 dias, 230g ± 20g alocados em 3 grupos: Controle, Lesão e Membrana Amniótica. A análise por imuno-histoquímica permitiu avaliar a expressão de biomarcador específico, sendo utilizada a proteína ácida fibrilar glial (GFAP- Abcam®), específica para astrócitos. Os resultados inéditos obtidos neste estudo indicam a eficácia da membrana amniótica visto que o grupo tratado com esse biomaterial apresentou redução na formação de astrócitos hipertróficos e da gliose, favorecendo a preservação da arquitetura do tecido nervoso quando comparado ao grupo Lesão sem tratamento.

Palavras-chave: Lesão Medular. Astrócitos. Imunohistoquímica. Membrana Amniótica.

Área do Conhecimento: Biomedicina

Introdução

A lesão medular (LM) é uma lesão de grande complexidade que compromete a medula espinhal (ME), parte do sistema nervoso central (SNC), responsável por executar funções vitais e de grande importância para o corpo. Apresenta em sua composição neurônios e grande variedade de células da glia, dentre as quais se destacam os astrócitos, cuja função está ligada ao suporte e sustentação do SNC. A LM apresenta diferentes graus e o nível de comprometimento das funções no indivíduo está associado à região da medula espinhal acometida. Pode ser causada por trauma, por tumores localizados próximos à medula espinhal ou consequente a um dano não traumático. O trauma físico, decorrente de um impacto, pode ser causado por inúmeros fatores no cotidiano, destacando-se os acidentes decorrentes de prática esportiva, em ambiente doméstico, resultados de atos violentos e de acidentes automobilísticos (GUIMARÃES et al., 2021; FERNANDES BONDAN et al., 2003). Em resposta ao trauma na região medular, inicia-se o processo inflamatório local, caracterizado por formação de edema, presença de células inflamatórias, recrutamento de células de defesa e liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios. Esses mecanismos de natureza endógena, associados às alterações bioquímicas do tecido lesionado, podem favorecer a progressão do processo de lesão tecidual e dificultar o retorno ao microambiente de homeostasia no tecido, induzindo a formação de cicatriz glial pelo aumento de astrócitos nessa região (BONDAN et al., 2017).

Atualmente, o tratamento da LM é pouco eficiente e apresenta grandes limitações, gerando sequelas graves e irreversíveis, consequentes a protocolos terapêuticos insuficientes, com redução ou perda total da função motora e da sensibilidade dos membros acometidos (BOULOS et al., 2023). Diante do cenário atual, novas propostas terapêuticas tem ganhado espaço para tratamento da LM, ressaltando a importância de pesquisas que minimizem o processo inflamatório pós lesão medular e suas consequências. Dentre as novas abordagens terapêuticas, destacam-se a aplicação da membrana

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

amniótica (MA), a terapia celular e a fotobiomodulação (PBM) (ORLANDIN et al., 2021; NEVES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2016).

A membrana amniótica humana tem sido amplamente utilizada em diferentes abordagens terapêuticas, como um método de tratamento inovador, tanto em experimentação animal (Campelo et al., 2018) quanto em aplicações clínicas (DE ALENCAR et al., 2021). Esse biomaterial é obtido por meio do processamento da placenta humana colhida a partir de cesárias a termo. A MA apresenta resultados promissores na terapia regenerativa de diferentes tecidos, dentre os quais destacam-se tratamento de queimaduras (AMORIM et al., 2021), tratamento na lesão de tendão (NICODEMO et al., 2017), redução da fibrose hepática (SANT'ANNA et al., 2011), tratamento de feridas em pé de pacientes com *Diabetes mellitus* tipo II (DE ALENCAR et al., 2021) e aplicação no tratamento de lesão medular em ratos, com a finalidade de diminuir os danos teciduais (OLIVEIRA et al., 2016). A terapia com a membrana amniótica tem se mostrado eficaz por apresentar características anti-inflamatória, antinecrótica, antifibrótica, antimicrobiana. Auxilia a imunomodulação, e apresenta baixa probabilidade de induzir resposta inflamatória. Além disso, sua estrutura atua como *scaffold*, proporcionando suporte para a proliferação tecidual. Assim, este estudo tem por objetivo identificar, por imuno-histoquímica, a eficácia da aplicação da Membrana amniótica no tratamento de lesões medulares, avaliando a presença de astrócitos hipertróficos, células associadas à formação de cicatriz glial.

Metodologia

O estudo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Experimentação com Uso de Animais e de Ética em Pesquisa (A17/CEUA/2014 e 063/2011-PH/CEP). Foram utilizados 15 ratos *Wistar*, machos, 60 dias de idade e peso entre 230 ± 20 g, alocados aleatoriamente em três grupos: Controle- simulação da lesão medular; Lesão- indução da lesão medular sem tratamento; Membrana amniótica- lesão medular seguida da aplicação de fragmento de membrana amniótica.

A membrana amniótica foi obtida a partir de placentas coletadas de cesarianas, com tempo de gestação a termo, e resultados negativos de exames sorológicos para HIV- 1 e 2, hepatite B e C e sífilis. As placentas foram transportadas para o laboratório, onde em condições estéreis a MA foi destacada do cório e exaustivamente lavada com PBS, anfotericina B, penicilina e estreptomicina, e a seguir seccionada em fragmentos de 2 cm^2 , os quais foram armazenados em tubos com DMEN, e utilizados em até 24 h após seu processamento.

Os procedimentos cirúrgicos para induzir a LM, após a anestesia com isoflurano (2%), compreenderam a remoção do processo espinhoso da medula óssea (laminectomia, entre T9-T10), para exposição da medula espinhal. Nos animais dos grupos Lesão e Membrana foi realizada a lesão medular por contusão, com o uso de mini guilhotina sustentando um peso de 10 g. Nos animais do grupo Controle houve apenas a simulação da lesão medular e da aplicação da MA, enquanto no grupo Membrana foi aplicado um fragmento de membrana amniótica.

Após 28 dias, os animais de todos os grupos foram eutanasiados para a obtenção de fragmentos dos tecidos da região de interesse, entre T9 e T10. Esse material foi imerso em formol tamponado a 10 % por 24 h e encaminhado para processamento histológico de rotina, que incluiu descalcificação com EDTA, diafanização em xilol, inclusão em parafina e realização de cortes histológicos de $5 \mu\text{m}$ de espessura, os quais foram colocados em lâminas previamente cobertas com poli-lisina para a reação de imuno-histoquímica.

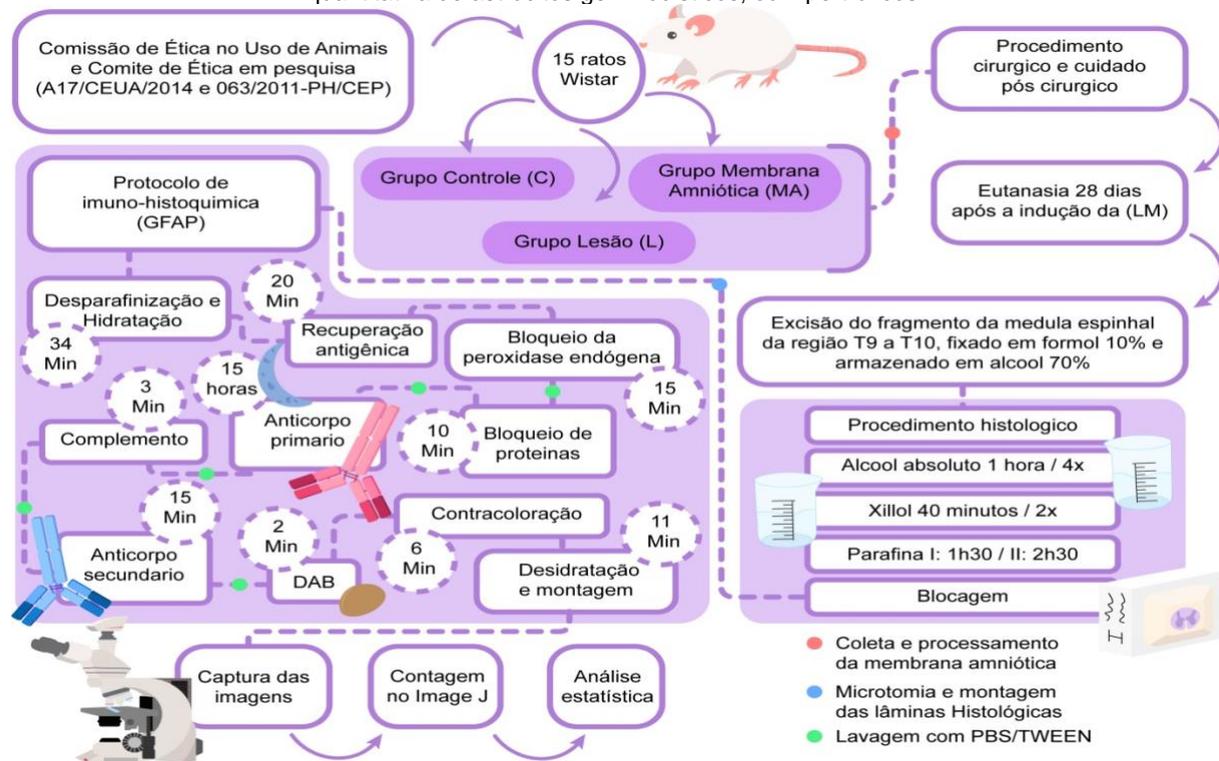
A Figura 1 apresenta o esquema representativo do protocolo do experimento seguindo para a análise por imuno-histoquímica, técnica que avalia a expressão de biomarcadores específicos, sendo selecionada a marcação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP- Abcam®), específica para astrócitos.

A reação imuno-histoquímica iniciou-se com a desparafinização dos cortes histológicos em estufa a $57 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. Durante esse período foram preparadas as soluções tampão de PBS + Tween 20 (NaCl anidro + N_2HPO_4 + NaH_2PO_4 + H_2O + água destilada) e de citrato (ácido cítrico anidro + água destilada) igualando o pH a 7,4 e 6,11, respectivamente. Após o início da desparafinização em estufa, os cortes foram colocados em berço de nylon e submersos em cubetas contendo, Xilol para a continuação da desparafinização, totalizando 2 trocas de 10 min cada. Em seguida, para o processo de hidratação, os cortes foram imersos em álcool em concentrações decrescentes (100%, 95% e 70%, 3 min/cada). A seguir, os cortes histológicos foram colocados em banho-maria, em solução de tampão citrato (10 mM, pH 6,0, a $96 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20min), seguido da imersão em água destilada, visando a

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

recuperação antigênica. Para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena, as lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em um berço de vidro, envolto com papel alumínio e presença de água oxigenada 3% (10 V), por 15min, seguido de 3 lavagens em PBS contendo 0,05% Tween 20 (Sigma, Saint Louis, MO, E.U.A.). As lâminas foram transferidas para uma câmara úmida, onde foi adicionada a solução Protein Block of EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (Abcam, Cambridge, UK; ab80436), por 10min, visando bloquear marcações inespecíficas. Os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo primário monoclonal anti-GFAP (ab10062, AbCam, clone GF5), na diluição 1/500, em câmara úmida a 4 °C, durante 14 h à 16 h. Após 4 lavagens de 3 min cada, com o tampão PBS+0,05% Tween 20 (PBST), foi inserida 1 gota do “*Mouse Specifying Complement*” - Kit Abcam® (ab80436) por 10 min. Novamente, foram feitas lavagens com PBST, 3 min cada, e adicionado o anticorpo secundário (Goat anti-rabbit HRP Conjugate of EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (Abcam, Cambridge, UK; ab80436), o qual ficou incubando por 15 min. Em seguida, foram realizadas 4 lavagens com tampão PBST, por 3 min cada, e adicionado o substrato/cromógeno DAB 110 mililitros – Kit Abcam®, por 2 min, seguido da contra coloração com hematoxilina de Harris por 35s, desidratação em álcool 95% e álcool 100%, 3 min em cada solução, diafanização por 5 min em Xilol, e montagem com Permount .

Figura 1 – Esquema representativo do protocolo do experimento adotado no presente estudo para avaliação quantitativa de astrócitos geminocísticos, ou hipertróficos.



Fonte: Autor (2023).

A imuno marcação da GFAP, específica para os astrócitos, foi avaliada qualitativamente e quantitativamente, por meio análise digital quantitativa morfométrica dos astrócitos. Para isto, as imagens microscópicas das imuno marcação foram visualizadas no Microscópio Trinocular Leica DM2500 e capturadas por uma câmera digital (LEICA DFC 425) e digitalizadas em 1024x768 pixels, 24 bits / pixel de resolução com uma ampliação global de 400x. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e em seguida ao teste paramétrico ANOVA para amostras independentes, seguido do teste de Tukey. As diferenças entre grupos foram testadas em um nível de significância de 95% ($p < 0.05$). A análise dos dados e a construção dos gráficos foi realizada com o programa GraphPad Prism 6.

Resultados

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

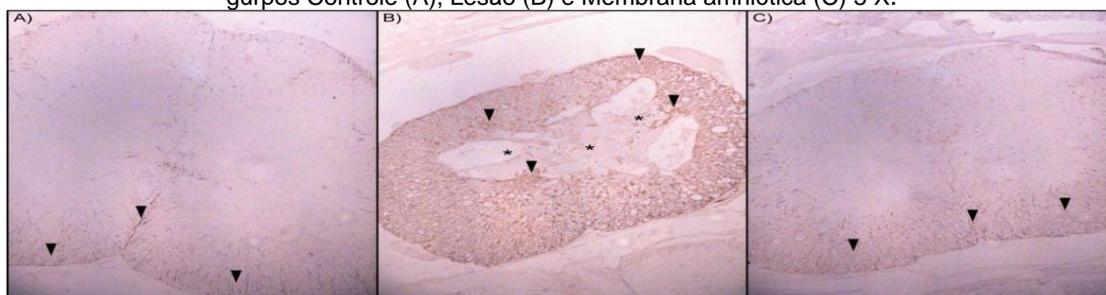
Análise Qualitativa

A técnica de imuno-histoquímica permitiu evidenciar especificamente os astrócitos, pois a Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), presente apenas nesta célula, apresentou marcação de coloração acastanhada, em virtude da reação de antígeno e anticorpo.

Observou-se que o grupo Controle apresentou baixa expressão dessa proteína (GFAP) e ausência de formação de cavitação, normalmente associada ao processo de morte celular e destruição tecidual. Além desses aspectos, havia presença discreta de astrócitos gemistocísticos, também denominados astrócitos hipertróficos, nesse grupo. Por outro lado, no grupo Lesão, houve aumento exacerbado de marcação da GFAP associado a elevado número de astrócitos gemistocísticos em toda região medular. Além disso, no entorno das cavidades císticas e micro cavidades, presentes nos cortes histológicos desse grupo, foi possível observar grande presença de astrócitos gemistocísticos com intensa marcação de GFAP. Essas cavitações apresentavam proporções maiores, bem como estavam em maior quantidade no grupo Lesão, comparado aos demais grupos estudados (Controle e Membrana Amniótica). No grupo tratado com MAH foram observadas cavitações de tamanho reduzido e em menor quantidade, comparado ao Grupo Lesão, com discreta expressão da Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), e baixa presença de astrócitos gemistocísticos.

Os aspectos descritos para todos os grupos estão apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Imagens representativas da expressão de GFAP (ponta de seta) e cavidades císticas (*) nos grupos Controle (A), Lesão (B) e Membrana amniótica (C) 5 X.



Fonte: Autor (2023).

Análise Quantitativa

A marcação imuno-histoquímica permitiu realizar a contagem de astrócitos gemistocísticos presentes nas regiões dorsal, ventral, direita e esquerda da medula excisada, e a análise quantitativa comparativa dos dados coletados dos grupos Controle, Lesão e Membrana amniótica humana. Os dados analisados por meio da ANOVA e Tukey mostram que a média do número de astrócitos no grupo Lesão, quando comparada com o grupo Controle, foi estatisticamente muito significativa ($30.88 \pm 3.56 \times 3.75 \pm 2.05$; $p < 0.01$). A comparação desses dados (Controle) com o grupo Membrana amniótica também apresentou elevada significância estatística ($30.88 \pm 3.56 \times 13.80 \pm 3.14$; $p < 0.01$). Entretanto, quando a média do número de astrócitos do grupo Controle foi comparada a do grupo Membrana amniótica não foi detectada diferença significativa ($3.75 \pm 2.05 \times 13.80 \pm 3.14$; $p > 0.05$), conforme apresentado na Figura 3.

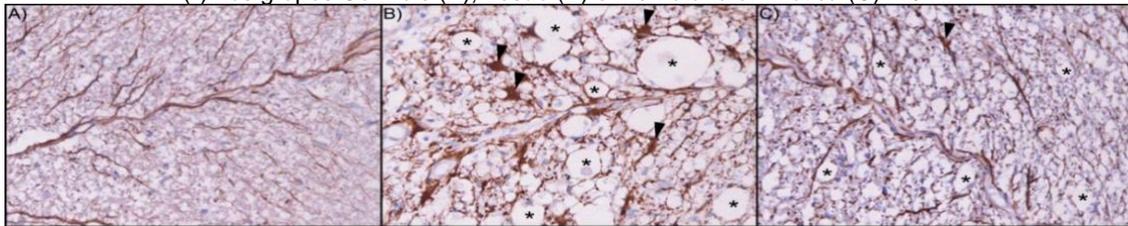
Discussão

A proliferação de astrócitos no SNC está associada ao processo de reparo de lesões no tecido e, em lesões de nível crítico, essa célula pode apresentar elevada reatividade, induzindo a formação de cicatriz glial, quando recebe a denominação de astrócito gemistocístico ou hipertrófico. O astrócito apresenta, em sua membrana celular, um marcador de superfície específico denominado Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), que pode ser utilizado como meio de identificação específico dessas células no tecido nervoso (GOMES et al., 2013).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

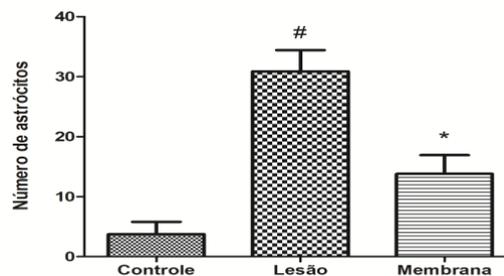
O reduzido número de astrócitos gemistocísticos detectado no grupo Controle indica que a simulação do dano medular não estimulou a proliferação ou a hipertrofia dessas células. Os cortes histológicos desse grupo apresentaram estrutura tecidual e arquitetura íntegra, sem a formação de cavidades císticas ou micro cavidades e reduzida expressão da proteína GFAP, quando comparados aos demais grupos.

Figura 3 - Imagens representativas da presença de astrócitos gemistocísticos (ponta de seta) e micro cavidades (*) nos grupos Controle (A), Lesão (B) e Membrana amniótica (C)- 40 X.



Fonte: Autor (2023).

Figura 4 - Gráfico representativo da quantificação de astrócitos gemistocísticos nos grupos Controle, Lesão e Membrana amniótica após marcação por imuno-histoquímica da proteína GFAP. * $p < 0.01$ versus grupo lesão; # $p < 0.01$ versus grupo controle.



Fonte: Autor (2023).

Por outro lado, a análise histológica dos espécimes do grupo Lesão revelou expressiva perda de tecido nervoso pela formação de muitas micro cavidades, bem como de cavidades com aspecto cístico, associadas a abundante infiltrado inflamatório na região da LM, e intensa presença de astrócitos gemistocísticos ao redor dessas cavidades, visíveis pelo aumento da expressão da proteína GFAP. A elevada expressão da proteína GFAP e a presença dos astrócitos gemistocísticos ao redor das cavidades revelam o comportamento dessas células da glia frente a uma agressão. Os astrócitos ocuparam todo o perímetro da lesão, formando uma fibrose ou cicatriz glial, prejudicando ou interrompendo a possível conexão entre os neurônios íntegros e alterando o microambiente tecidual, prejudicando o restabelecimento das características teciduais normais (FERNANDES BONDAN et al., 2003; BONDAN et al., 2017).

Tanto a análise qualitativa, quanto a quantitativa, revelaram que o grupo tratado com Membrana Amniótica humana apresentou diminuição da resposta inflamatória no local da lesão com reduzida formação de micro cavidades e de cavidades císticas, baixa expressão da proteína GFAP e discreta presença de astrócitos gemistocísticos. Os resultados sugerem, de forma inédita, que o tratamento com a membrana amniótica humana controla o aumento da multiplicação e da reatividade dos astrócitos, que se apresentaram em menor quantidade e distribuídos entre as fibras nervosas.

Os resultados indicam que a aplicação da MAH, na forma de fragmento, apresentou ação neuroprotetora, por recobrir e proteger a área da lesão e controlar a progressão do processo inflamatório, considerando a reduzida presença de células inflamatórias no grupo tratado quando comparado ao observado no grupo Lesão. Em consequência, houve redução no processo de degeneração dos axônios na região da LM, e na formação da cicatriz glial, minimizando os efeitos endógenos negativos, característicos do período pós LM. Todos esses aspectos culminaram em um microambiente mais favorável à regeneração tecidual na região da LM após o tratamento com esse biomaterial.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Novos estudos devem ser desenvolvidos buscando reforçar os promissores resultados obtidos no presente estudo, com o intuito de estabelecer protocolos inovadores de tratamento para LM, que permitam recuperar as funcionalidades perdidas em consequência do dano no SNC, utilizando biomateriais de grande disponibilidade e fácil manipulação, descartados após o parto.

Conclusão

Os resultados do presente estudo permitiram verificar, por imuno-histoquímica, a eficácia da aplicação de fragmentos da membrana amniótica para tratamento de lesão medular induzida em animais de experimentação. Observou-se que o grupo tratado com esse biomaterial apresentou redução na formação de astrócitos hipertróficos, reduzindo a gliose e favorecendo a preservação da arquitetura do tecido nervoso, quando comparado ao grupo Lesão sem tratamento. Sugere-se que a aplicação da MA na forma de fragmento mantém o microambiente tecidual favorecendo o processo de reparo da lesão medular.

Referências

AMORIM, F.C.M. *et al.* Amniotic membrane applied to burns healing: Pre-clinical study. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. 38110414286-38110414286, 2021.

BONDAN, Eduardo; CARDOSO, Carolina; MARTINS, Maria de Fátima. Curcumin decreases astrocytic reaction after gliotoxic injury in the rat brainstem. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, p. 546-552, 2017.

BOULOS, Rita T. *et al.* A case report: The first show phenomenon in the treatment of spinal cord injury with Regentime procedure using autologous bone marrow-derived stem cells. **Clinical Case Reports**, v. 11, n. 7, p. e7568, 2023.

CAMPELO, Mariana Barbosa Dias *et al.* Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 33, p. 144-155, 2018.

FERNANDES BONDAN, Eduardo *et al.* Estudo da imunorreatividade astrocitária para GFAP e vimentina no tronco encefálico de rato. s wistwit submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio. **Arquivos de neuro-psiQUIATRIA**, v. 61, n. 3A, p. 642-649, 2003.

GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI, Vanessa Pereira; DINIZ, Luan. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos avançados**, v. 27, p. 61-84, 2013.

GUIMARÃES, Carolina Lobo *et al.* Reabilitação sensório-motora associada à fotobiomodulação transcraniana em pacientes com lesão do sistema nervoso central. **Revista Univap**, v. 27, n. 56, 2021.

DE ALENCAR, F. Santos J. *et al.* Diabetic Foot Wounds Treated With Human Amniotic Membrane and Low-level Laser Therapy: A Pilot Clinical Study. **Wound Management & Prevention**, v. 67, n. 8, p. 16-23, 2021.

NEVES, MF. *et al.* Comparative analysis of movements after experimental spinal cord injury treated with amniotic membrane: Pilot study, MA LM, v.2, p. 1-5, 2018.

NICODEMO, Mariana de Castro *et al.* Amniotic membrane as an option for treatment of acute Achilles tendon injury in rats¹. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, p. 125-139, 2017.

OLIVEIRA, E. C. L. *et al.* Avaliação histológica da eficácia da membrana amniótica no processo de reparo de lesão medular induzida em ratos, 2016.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ORLANDIN, J. *et al.* Treatment of Chronic Spinal Cord Injury in Dogs Using Amniotic Membrane-Derived Stem Cells: Preliminary Results, *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, p. 39-49, 2021.

SANT'ANNA, L. *et al.* Amniotic Membrane Application Reduces Liver Fibrosis in a Bile Duct Ligation Rat Model. *Cell Transplantation*, v. 20, p. 441–453, 2011.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)