

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS TRONCO AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA NA REGENERAÇÃO DO NERVO TIBIAL DE COELHOS MEDIANTE TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO COM PRÓTESE DE SILICONE

COLOMÉ, L. M.¹; GOMES, C.²; CROSIGNANI, N.²; MAGANO, K.³; FOERSTROW, L.P.⁵; PIPPI, N. L.⁴; CONTESINI, E. A.⁵; CIRNE-LIMA, E. O.⁶; LOSS, F.R.⁷

Resumo

Este estudo apresenta um modelo experimental de defeito agudo em nervo periférico para avaliação da regeneração nervosa mediante técnica de tubulização associada à inoculação de células tronco autólogas de medula óssea. Foram utilizados 12 coelhos Nova Zelândia albinos, submetidos à secção bilateral do nervo tibial e posterior reparo mediante utilização de câmara de silicone. Internamente à prótese de tubulização do nervo tibial esquerdo em todos os animais, foram inoculadas as células tronco autólogas de medula óssea, coletadas a partir do úmero. Como grupo controle (nervo tibial direito), mediante aplicação de mesma técnica de reparo, solução de NaCl foi administrada internamente à prótese. Após 30 dias de observação, os animais foram eutanasiados e procedeu-se a avaliação histológica dos segmentos nervosos através das colorações de hematoxilina-eosina, luxol fast blue e azul de toluidina. Com os resultados, foi possível concluir que o transplante de células tronco autólogas associada à técnica de tubulização apresenta vantagens no processo de regeneração nervosa periférica.

Palavras-chave: células tronco; nervo tibial; tubulização; coelhos

Introdução

Lesões traumáticas, vasculares, inflamações e neoplasias podem produzir ruptura de algumas ou todas fibras em um nervo periférico, resultando em disfunção sensitiva e/ou motora focal. A regeneração funcional após uma reparação nervosa é um processo complexo que envolve fatores locais e sistêmicos. Neste particular, os mecanismos básicos de mielinização das fibras regeneradas e do processo de crescimento e orientação das fibras encontram-se ainda parcialmente determinados (DAZA et al., 1999). No intuito de transpor estas dificuldades, pesquisas vêm objetivando conhecer o resultado da associação de técnicas consagradas com alternativas novas no âmbito da engenharia tecidual. Como exemplo, citamos a utilização de substâncias exógenas para promover um acréscimo na qualidade e velocidade de regeneração. Neste estudo, o emprego da técnica de tubulização junto à terapia celular mononuclear autóloga de medula óssea representou bem esta tendência. A recente e promissora área da medicina regenerativa vem abrindo perspectivas inovadoras no tratamento de inúmeras doenças, utilizando terapias celulares, fatores de proliferação e diferenciação celular e biomateriais que permitem ao próprio organismo reparar tecidos e órgãos lesados (PINEDO, 2001; BARTH, 2006). Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de regeneração do nervo tibial de coelhos Nova Zelândia,

¹ Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

² Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Acadêmico de Medicina Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Departamento de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁵ Departamento de Medicina Animal, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁶ Departamento de Patologia Clínica Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁷ Acadêmica de Medicina Veterinária, UPF, Passo Fundo, RS, Brasil.

1 mediante a associação da terapia celular por transplante de células tronco autólogas de
2 medula óssea com a técnica de tubulização através de prótese de silicone.

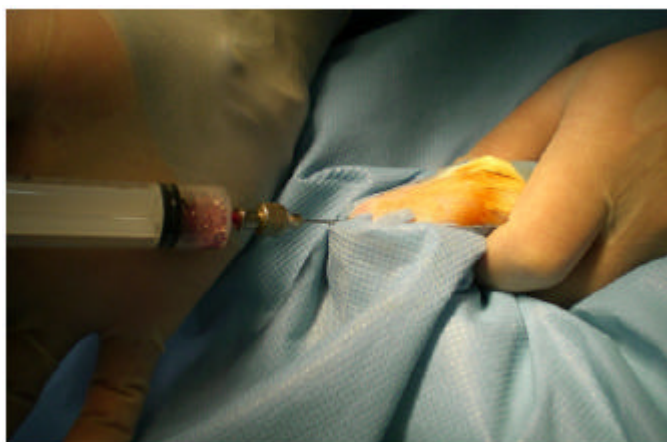
3 4 **Materiais e métodos**

5 6 **Animais**

7 Foram utilizados 12 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) Nova Zelândia albinos, de ambos
8 os sexos, com aproximadamente cinco meses de idade, pesando em média de 2,1kg e
9 provenientes da Escola Técnica Agrícola (ETA) de Viamão-RS. Os animais foram mantidos
10 durante o período peri-operatório na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital
11 de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

12 13 **Coleta e processamento de medula óssea**

14 Realizou-se extração de medula óssea, bilateralmente a partir do tubérculo maior do
15 úmero, utilizando-se agulha de Osgood (25x10) acoplada à seringa de 10 mL heparinizada.
16 Para realização deste procedimento aplicou-se cetamina (40mg.kg^{-1}), midazolam (2mg.kg^{-1}) e
17 citrato de fentanila ($0,8\mu\text{g.kg}^{-1}$) todos por via intramuscular e isoflurano via máscara facial
18 para manutenção do plano anestésico. As frações de medula óssea foram encaminhadas
19 sob refrigeração ao Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de
20 Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O aspirado celular foi processado com Ficoll objetivando
21 separar a fração celular mononuclear do restante dos constituintes da medula óssea.

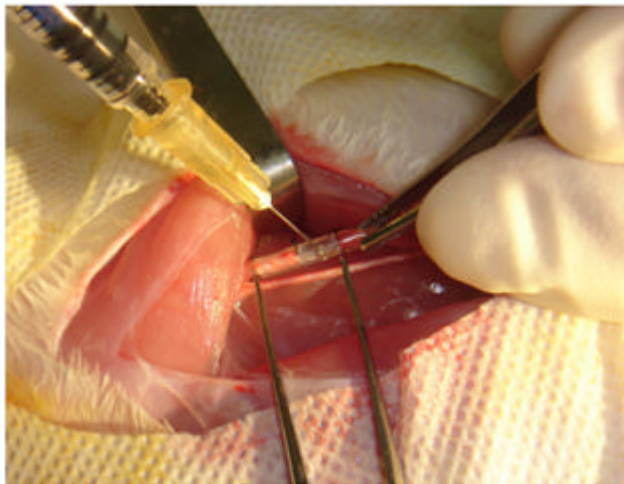


38 Figura 1: Coleta de medula óssea a partir do
39 tubérculo maior do úmero

40 41 **Modelo experimental e transplante das células tronco autólogas de medula óssea**

42 Após o período de processamento da fração de medula óssea, aproximadamente 4
43 horas após a coleta, os animais foram novamente anestesiados utilizando-se cetamina
44 (40mg.kg^{-1}), midazolam (2mg.kg^{-1}) e meperidina (5mg.kg^{-1}) por via intramuscular e isoflurano
45 via tubo endotraqueal devido ao maior tempo de execução deste procedimento. Solução de
46 NaCl 0,9% foi administrada (5mL/kg/h) via catéter na veia marginal auricular. Todos animais
47 receberam ampicilina sódica, (10mg.kg^{-1}) e cetoprofeno (4mg.kg^{-1}) por via subcutânea (SC)
48 30 minutos antes do procedimento como antibioticoprofilaxia e terapia analgésica e
49 antiinflamatória. Promoveu-se acesso cirúrgico pela face lateral da coxa (bilateralmente) e

1 localizou-se a porção tibial do nervo isquiático criando-se o defeito nervoso no terço médio
2 de seu trajeto. Após, uma câmara siliconada foi fixada no epineuro com fio monofilamentar
3 de náilon calibre 6-0. No espaço criado entre os cotos nervosos do membro esquerdo (5mm),
4 foram injetadas as células autólogas de medula óssea (1×10^6 células em 0,1mL). No membro
5 direito, foi injetado o mesmo volume de NaCl 0,9% internamente à prótese. Utilizou-se lupa
6 cefálica objetivando a magnificação da imagem. Os animais foram observados por um
7 período de 30 dias, quando então foram eutanasiados para avaliação histológica. As
8 amostras de nervo tibial foram fixadas em dois tipos de soluções; solução de glutaraldeído ou
9 formol tamponado a 10%.



10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
Figura 2: Prótese de silicone fixada às extremidades nervosas seccionadas e a injeção da fração de células tronco no interior da câmara.

Processamento, análise das amostras e tratamento estatístico dos dados

Doze segmentos de nervos tibiais (seis animais) foram fixados com glutaraldeído e corados com azul de toluidina 0,25%. Estas amostras foram avaliadas qualitativamente. Outras doze amostras (seis animais) foram fixadas em formol tamponado a 10% e coradas com luxol fast blue e hematoxilina-eosina (HE). Os cortes histológicos foram avaliados comparativamente de acordo com: presença de células inflamatórias (eosinófilos), formação de câmaras de digestão (degeneração Walleriana), visualização de grânulos de hemossiderina e presença de granulomas ou células gigantes.

Resultados e discussão

Da-Silva et al. (2003) e Oliveira et al. (2004) relatam que numerosos estudos avaliaram a técnica de tubulização demonstrando significativa melhora no processo de regeneração através da manipulação do microambiente. Concordando com estes autores e acreditando nas vantagens do processo de tubulização, promoveu-se o estudo dos possíveis efeitos benéficos da utilização de células tronco autólogas de medula óssea.

Na avaliação dos resultados, algumas observações não apresentaram diferenças entre os grupos, como por exemplo o exame neurológico dos membros posteriores, presença de infecção cirúrgica e deiscência da sutura da prótese. Também não houve diferença entre os grupos quanto à formação tecidual internamente à câmara, pois em todos animais observou-se tecido de regeneração formando uma “ponte” interligando as extremidades

1 nervosas. Estas observações vão ao encontro dos achados de Da-Silva et al. (2003), que
2 também observaram regeneração em todos animais de seu estudo. Contrariamente, Chen et
3 al. (2006) utilizando 15 mm de espaçamento entre os cotos nervosos de ratos Wistar e 10
4 semanas de observação pós-operatória, encontraram diferença entre o grupo tratado (células
5 tronco mesenquimais) e o controle. Nas lâminas coradas pelo HE foi observada a presença
6 de granulomas compostos de macrófagos, células epitelióides e células gigantes associados
7 à presença do fio de sutura. Não encontrou-se diferença significativa entre os grupos a partir
8 desta variável (teste estatístico de McNemar). Estes achados podem ser explicados pelo fato
9 da reação granulomatosa estar diretamente ligada a presença de material estranho no tecido
10 nervoso, indicando reação prolongada entre hospedeiro e material estranho (THOMPSON,
11 1983).

12 Relacionando as outras alterações histológicas, Karanth et al. (2006) relatam que a
13 resposta imune facilita a remoção de debris mielínicos e axonais e incita a produção de
14 citocinas e fatores neurotróficos, beneficiando o processo de regeneração axonal.
15 Constituinte desta reação imunológica, a infiltração por eosinófilos foi observada na grande
16 maioria dos cortes histológicos, apresentando valores médios inferiores para o grupo
17 tratamento. Contudo, tal diferença não demonstrou significância estatística (teste de
18 Wilcoxon). De forma geral, infere-se que a presença em menor quantidade de eosinófilos no
19 grupo tratado, esteja ligada a uma maior velocidade de resolução deste processo e, portanto,
20 sua produção e aparecimento estariam em fase de declínio.

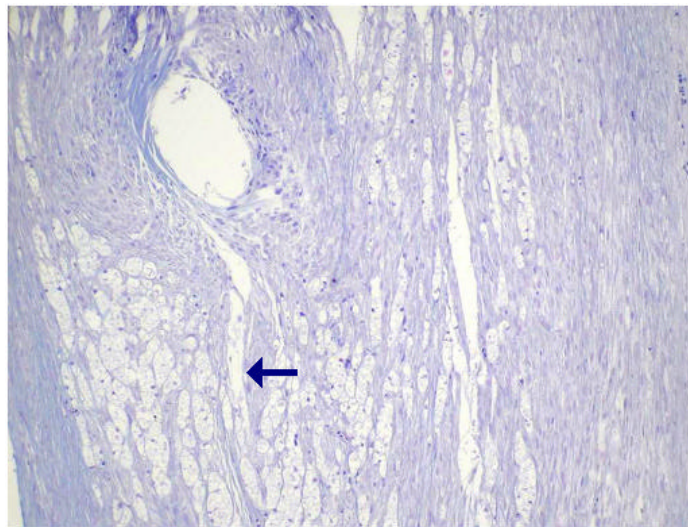
21 Em todas as lâminas observaram-se macrófagos carregados de hemossiderina em
22 quantidades discretas. Hemossiderina é um pigmento marrom contendo ferro e usualmente
23 encontrado nos macrófagos do sistema retículo-endotelial. É um achado bastante comum,
24 aparecendo na forma de manchas amarronzadas nos tecidos corados por HE. A quantidade
25 de hemossiderina, pode dependendo das circunstâncias que deram início ao acúmulo ser
26 uma indicação das reservas de ferro corporal ou de degradação sanguínea. Assim,
27 concentração acentuada de hemossiderina numa área de tecido pode indicar hemorragia
28 prévia (THOMPSON, 1983; GRINDEM et al., 2002). No estudo em questão, constatou-se o
29 aparecimento de focos de hemossiderina em maior taxa no grupo tratado, contudo, tal
30 diferença não foi estatisticamente significativa (teste de Wilcoxon).

31 Outras observações notadas com a avaliação dos cortes histológicos foram a
32 expansão do perineuro pela deposição de colágeno ou formação de edema, juntamente com
33 as numerosas câmaras de digestão indicando degeneração Walleriana, mais abundantes
34 nas porções proximais das secções. Para Almeida (2006), a regeneração após uma lesão
35 axonal inicia-se com três semanas de evolução e somente ocorre se houver preservação do
36 corpo celular. Para Seim III (2005), a velocidade de regeneração nervosa em pequenos
37 animais pode atingir até 4 mm/dia. Em roedores e outros animais como os coelhos, por
38 exemplo, acredita-se que esta taxa possa ser ainda maior devido ao metabolismo
39 extremamente acelerado.

40 Com os cortes histológicos semi-finos corados com azul de toluidina, avaliou-se de
41 forma qualitativa a regeneração nervosa. Identificou-se fibras regeneradas de orientação
42 longitudinal e mielina fina. Este achado permite inferir que o processo regenerativo ainda não
43 havia se completado em ambos grupos de estudo. Observou-se ainda número variável de
44 neo-fascículos com fibras desviadas por vasos reoformados de parede fina e luz ampla
45 independente do grupo estudado. Outro achado passível de ser descrito foi a identificação de
46 células de Schwann supranumerárias. Através da avaliação morfométrica das fibras
47 nervosas regeneradas a ser realizada em uma etapa posterior, será possível mensurar
48 objetivamente variáveis como diâmetro das fibras mielínicas, diâmetro dos axônios
49 mielínicos, espessuras das bainhas de mielina e diâmetro dos axônios amielínicos

1 (STOPIGLIA et al., 1998). Chen et al. (2006) também observaram em seu estudo maturação
2 e diâmetro axonal incompleto em comparação com nervos saudáveis.

3 Pesquisas vem confirmando os benefícios da administração exógena de substâncias no
4 microambiente gerado através da tubulização nervosa, dentre estas citam-se os fatores
5 neurotróficos, células em cultura e citocinas (TERENGI, 1999; HEINE et al., 2004; CHEN et
6 al., 2005; AQUINO et al., 2006). O trabalho experimental desenvolvido por Chen et al. (2006),
7 demonstra o benefício do emprego dos aspirados de medula óssea no tecido nervoso
8 lesionado. Eles relatam que células tronco derivadas de medula óssea, por apresentarem
9 população heterogênea com distinta plasticidade, podem diferenciar-se numa variedade de
10 tipos celulares, incluindo adipócitos, condrócitos, osteócitos, miócitos, hepatócitos, astrócitos e
11 neurônios. Concordando com estes autores, o experimento em questão demonstrou através
12 de seus resultados, vantagens no processo regenerativo do nervo tibial seccionado, tubulizado
13 e transplantado com células autólogas de medula óssea, embora este estudo não venha
14 elucidar qual o possível mecanismo de plasticidade ou suporte das células transplantadas ou
15 fatores de crescimento produzidos.



32
33
34
35
36
37

Figura 3: Fotografia demonstrando presença de degeneração Walleriana pela formação das câmaras de digestão no tecido nervoso regenerado da porção média do nervo tibial (seta).

38 Conclusão

39 Mediante os resultados obtidos é possível concluir que a técnica de tubulização em
40 coelhos proporciona uma boa evolução do processo de regeneração nervosa em um período
41 de 30 dias de observação pós-cirúrgica. Pela análise das lâminas histológicas observa-se
42 presença de bainha de mielina fina em ambos os grupos de tratamento, concluindo-se que o
43 processo regenerativo ainda encontra-se incompleto. Apesar do exposto, segundo o teste
44 estatístico de Wilcoxon, existe diferença significativa entre a presença de degeneração
45 Walleriana nos dois grupos de estudo, oportunizando concluir que o tratamento com células
46 tronco autólogas de medula óssea apresenta vantagens no processo de regeneração do
47 nervo periférico sob a técnica de tubulização. Com as outras variáveis analisadas, apesar da
48 diferença entre os grupos não ser estatisticamente significativa, é possível inferir que o

1 processo regenerativo acontece de uma forma mais rápida no grupo tratado com as células
2 tronco autólogas de medula óssea.

3 Trabalho aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto
4 Alegre (HCPA/UFRGS) sob o protocolo 06/401.

8 Referências

10 ALMEIDA, D.F. Trauma de nevo periférico. **EMGlab**. Disponível em:
11 <http://www.emglab.com.br/html/trauma_de_nervos.html>. acesso em: 4 nov. 2006.

12 AQUINO, J.B. et al. In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells
13 into mature Schwann cells. **Experimental neurology**, n. 198, p. 438-449, 2006.

14 BARTH, W.L. **Células tronco e bioética: o progresso biomédico e os desafios éticos**.
15 Porto Alegre: Edipucrs, 2006.

16 CHEN, C. J. et al. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair.
17 **Experimental neurology** (2006) prelo. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.12.004.

18 CHEN, Y.Y. et al., Axon and Schwann cell partnership during nerve regrowth. **Journal of**
19 **neuropathology and experimental neurology**, n.64, n.7, p. 613-622, 2005.

20 DAZA, C.H.M. et al. Câmaras de silicona como injerto nervioso, análisis de la especialidad de
21 regeneración del nervio peroneal o tibial : estudio experimental em ratas. **Revista**
22 **Colombiana de Ortopedia y Traumatologia**, v.13, n.3, p. 285-292, 1999.

23 DA-SILVA, C.F. et al. Influence of highly purified preparations of hyaluronic acid on peripheral
24 nerve regeneration *in vivo*. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.20, n.2, p. 121-
25 124, 2003.

26 GRINDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinics**
27 **of North America: Small Animal Practice** v.32, p. 1313-1374, 2002.

28 HEINE, W. et al. Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through
29 chronically denervated peripheral nerves. **Experimental neurology**, n.189, p. 231-240, 2004.

30 KARANTH et al. Nature of signals the initiate the imune response during Wallerian
31 degeneration of peripheral nerves. **Experimental neurology**, n. 202, p. 161-166, 2006.

32 NARDI, N.B.; ALFONSO, Z.C. Células tronco hematopoéticas. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T.
33 **Células tronco, a Nova Fronteira da Medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p. 49-65.

34 OLIVEIRA, A.L.R.; PIERUCCI, A.; PEREIRA, K.B. peripheral nerve regeneration through the
35 nerve tubulization technique. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 21, n. 4, p.
36 225-231, 2004.

37 PINEDO, U.G. Utilización de prótesis de quitosana y silicona em la regeneración del nervio
38 ciático axotomizado de ratas. **Archivos de neurociencias mexicanas**, v.6, n. 4, 184-193,
39 2001.

40 SEIM III, Cirurgia dos nervos periféricos. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**.
41 São Paulo: Roca, 2005. cap. 43, p.1336-1350.

42 STOPIGLIA, A.J. et al. Avaliação morfométrica de fibras nervosas do nervo ulnar após
43 reparação cirúrgica com auto-enxerto e prótese tubular em cães. **Brazilian Journal of**
44 **Veterinary Research and Animal Sciences**, v.35, n.2, p.80-83, 1998.

45 TERENCE, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of anatomy**,
46 v. 194, p.1-14, 1999.

47 THOMPSON, R.G. Inflamação e reparação. In: THOMPSON, R.G. **Patologia geral veterinária**.
48 Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1983. cap. 4, p. 144-250.