

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS
TRONCO AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA EM
ASSOCIAÇÃO COM TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO
POR PRÓTESE DE SILICONE NA REGENERAÇÃO
DO NERVO TIBIAL DE COELHOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lucas Marques Colomé

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS TRONCO
AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA EM ASSOCIAÇÃO COM
TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO POR PRÓTESE DE SILICONE
NA REGENERAÇÃO DO NERVO TIBIAL DE COELHOS**

por

Lucas Marques Colomé

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Ney Luis Pippi

Santa Maria, RS, Brasil

2007

© 2007

Todos os direitos autorais reservados a Lucas Marques Colomé. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor. Endereço: Rua Faria Santos, 512/204 – Bairro Petrópolis, Porto Alegre – RS, CEP. 90670150 Fone (0xx)51 21039747; End. Eletr: lucascolome@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS TRONCO AUTÓLOGAS DE
MEDULA ÓSSEA EM ASSOCIAÇÃO COM TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO POR
PRÓTESE DE SILICONE NA REGENERAÇÃO DO NERVO TIBIAL DE COELHOS**

elaborada por
Lucas Marques Colomé

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ney Luis Pippi, Dr.
(Presidente/Orientador)

Emerson Antonio Contesini, Dr. (UFRGS)

Elizabeth Obino Cirne Lima, Dra. (UFRGS)

Santa Maria, 05 de março de 2007.

DEDICATÓRIA

Acreditar que é possível, pesar e assumir os riscos, cerrar os punhos e partir pra luta. Aliada ao desejo de alcançar o objetivo, a fé torna-se a força mais poderosa do mundo e com ela ao seu lado, tudo se torna possível. Mais essa importante etapa vencida em minha vida, eu dedico com todo o amor que tenho em meu peito a meus pais Teodoro e Clara, por terem me ensinado, sempre através do exemplo, a lutar com esforço, dedicação e perseverança. Que eu possa estar sempre perto de vocês, mesmo que pelo pensamento, pois assim terei a certeza que continuam iluminando minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Orientador, Dr. Ney Luis Pippi pelo crédito a mim concedido, pelos relevantes conselhos e preocupação profissional. Enfim, por ser um exemplo a ser seguido e pela característica de reconhecer as pessoas como únicas, com suas melhores virtudes e suas dificuldades próprias.

Ao “supervisor” da fase experimental de meu mestrado, Dr. Emerson Contesini, obrigado por aceitar o desafio de observar meu desempenho longe de minha instituição de origem. Agradeço pelo estímulo firme e cobrança responsável durante a realização da fase prática deste curso.

À Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima, agradeço muito pela sempre pronta disposição em auxiliar, pela oportunidade única em trabalhar com este tema tão relevante e pela abertura das portas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

À Dra. Dominguita Luhers Graça, pelo carinho, compreensão e pela mão sempre disposta em ajudar. Agradeço de coração pela orientação sobre os procedimentos e técnicas com as amostras e pela dedicação na avaliação dos resultados finais.

À Dra. Luise Meurer, pelo compromisso assumido e valiosa orientação nas diferentes etapas de realização do experimento.

Aos colegas Cristiano Gomes e Nádia Crossignani pela amizade e ajuda durante todas as etapas de execução do projeto. Acredito que as palavras para agradecer a atenção dispensada por vocês tem um significado muito pequeno diante de seus esforços, mesmo assim deixo aqui meu mais sincero muito obrigado.

Aos meus queridos estagiários e bolsistas, Karina, Liziane e Jardel, da mesma forma, obrigado pela ajuda e pelo empenho nas horas em que mais precisei. Sou muito grato a vocês por muitas vezes até mesmo abdicarem de suas atividades rotineiras em benefício de nossa pesquisa. Vocês foram fundamentais para tornar este trabalho possível.

À equipe do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Ana Helena e Ana Ayala, obrigado pelas conversas e orientações; e por cuidarem com tanto carinho das “tão cobiçadas e aguardadas” células tronco.

À equipe do Centro de Microscopia Eletrônica (CME), principalmente ao Professor Dr. Luis Frederico Pinheiro Dick e a Moema pelo crédito e dedicação no preparo das amostras.

À equipe envolvida com toda a “logística” e preparação de material para a execução das cirurgias: Gisele, Marcos, Michele (HCV/UFRGS) e Eduardo e Tânia (HCPA).

Agradeço também às pessoas que através do contato profissional tornaram-se meus amigos, como o Professor Igor e o funcionário Paulo da Escola Técnica Agrícola de Viamão. Muito obrigado pela ajuda, cuidado e orientação na manipulação com esta espécie tão “diferente” para mim e tão agradável de trabalhar.

Aos meus pais, a quem dediquei este estudo, acima e além de tudo amigos e conselheiros, minha eterna gratidão pelo esforço, preocupação constante e abnegação imensuráveis.

À Letícia, uma espécie de “irmã-mãe”, sempre extremamente lúcida, justa, correta e imparcial, que apesar de ter também suas dificuldades e contratemplos rotineiros, achava tempo para conversar sobre as coisas boas e nem tão boas assim da vida. Obrigado pelo socorro, pela mão carinhosa e compreensiva. Meu muito obrigado também ao Eduardo, pela enorme compreensão e disposição instantânea em ajudar em tudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio à pesquisa e pela bolsa cedida.

E finalmente, aos animais, meu mais sincero respeito e gratidão, por emprestar a vida em benefício de minha pesquisa, da ciência e da humanidade. Muito obrigado!

“... não basta o compromisso, vale mais o coração... ninguém sabia e ninguém viu que eu estava ao teu lado então...”.

(Cássia Eller)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

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

AUTOR: LUCAS MARQUES COLOMÉ
ORIENTADOR: NEY LUIS PIPPI
Santa Maria, 05 de março de 2007.

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. No trabalho 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

ABSTRACT

MS dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

AUTOLOGOUS STEM CELLS FROM BONE MARROW IN THE REGENERATION OF TIBIAL NERVE OF RABBITS USING THE TUBULIZATION TECHNIQUE WITH SILICONE TUBE

AUTHOR: LUCAS MARQUES COLOMÉ

ADVISER: NEY LUIS PIPPI

Santa Maria, march, 05, 2007.

This study presents an experimental model of an acute defect in a peripheral nerve to evaluate neural regeneration using a tubulization technique associated with the inoculation of autologous stem cells from bone marrow. A total of 12 New Zealand white rabbits underwent a bilateral dissection of the tibial nerve followed by repair with silicone tubulization. On the left tibial nerve of all animals, the tube was filled with autologous bone marrow-derived stem cells collected from the humerus. For control, using the same repair technique, tubes were filled with a NaCl solution in the right tibial nerve. After 30 days of observation, the animals were euthanized and a histological evaluation of the collected nerve segments was performed by staining with hematoxylin-eosin, luxol fast blue, and toluidine blue. From the results it is possible to conclude that the transplanted autologous stem cells associated with the tubulization technique present an advantage in the peripheral nerve regeneration process.

Key-words: stem cells, tibial nerve, tubulization, rabbits

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática da propriedade das células tronco de se dividirem dando origem a células que permanecem indiferenciadas ou células que se diferenciam e amadurecem	20
FIGURA 2 - Representação esquemática do procedimento de isolamento da porção mononuclear a partir de fração total de medula óssea (MO)	25
FIGURA 3 - Representação esquemática das estruturas nervosas microscópicas demonstradas em corte transeccional esquemático de nervo periférico. Observar a disposição e ordenamento dos feixes e fascículos nervosos.....	27
FIGURA 4 – Representação esquemática de A) técnica de tubulização para reparo de secção nervosa. B) formação da ponte não celular entre as extremidades nervosas	33
FIGURA 5 - Representação esquemática da extremidade do axônio e seu cone de crescimento. Observar a presença dos lamelipódios e filopódios.....	37
FIGURA 6 - Fotografia demonstrando a coleta de medula óssea a partir do tubérculo maior do úmero utilizando-se agulha de Osgood (25x10) acoplada à seringa de 10 mL previamente heparinizada.....	40
FIGURA 7 – Fotografia demonstrando a prótese de silicone fixada às extremidades nervosas seccionadas e injeção da fração de células tronco (1.10^6 células em 0,1mL) no interior da câmara.....	44
FIGURA 8 – Fotografia demonstrando o crescimento nervoso dentro da prótese de silicone. O fio de sutura amarrado à extremidade serviu como marcação para porção proximal do nervo tibial.....	51

FIGURA 9 - Fotografia demonstrando infiltração por eosinófilos (seta) no tecido nervoso regenerado da porção média do nervo tibial (corte longitudinal com coloração de HE e aumento de 400X).....54

FIGURA 10 - Fotografia demonstrando presença de degeneração Walleriana pela formação das câmaras de digestão (seta inferior) no tecido nervoso regenerado da porção média do nervo tibial. A seta superior demonstra o orifício deixado pelo material de sutura (corte longitudinal com coloração de luxol fast blue e aumento de 400X).....59

FIGURA 11- Fotografia demonstrando o padrão de regeneração das fibras nervosas na porção distal do nervo tibial direito (corte longitudinal ultra-fino com coloração de azul de toluidina 0,25% e aumento de 400X).....61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Volume de medula óssea aspirada a partir do tubérculo umeral direito (UD) e esquerdo (UE) para posterior processamento e separação da fração mononuclear.....	41
TABELA 2 - Avaliação das diferentes variáveis (granuloma, eosinófilos e hemossiderina) observadas e seus respectivos valores referentes ao nervos direito (controle) e esquerdo (tratamento) nos cortes corados com HE.....	52
TABELA 3 -Valores em % da observação de degeneração Walleriana pela presença de câmaras de digestão nos cortes corados com luxol fast blue.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Representações gráficas dos valores individuais (A) e médios (B) para a variável eosinófilos nos grupos controle (D) e tratamento (E).....	54
GRÁFICO 2 - Representações gráficas dos valores individuais (A) e médios (B) para a variável hemossiderina nos grupos controle (D) e tratamento (E).....	56
GRÁFICO 3 - Representações gráficas dos valores individuais (A) e médios (B) para a variável degeneração Walleriana nos grupos controle (D) e tratamento (E).....	58

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Metodologia de avaliação das alterações encontradas nos cortes histológicos corados com HE e luxol fast blue.....	46
--	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Solução fixadora para a base de glutaraldeído objetivando a estabilização dos tecidos.....	71
ANEXO 2 – Protocolo de preparação de amostras biológicas para realização de cortes ultra-finos.....	72

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	04
AGRADECIMENTOS.....	05
RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE GRÁFICOS.....	11
LISTA DE QUADROS.....	12
LISTA DE ANEXOS.....	13
SUMÁRIO.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Terapia celular.....	18
2.2 Conceitos e fisiologia das células tronco	19
2.3 Obtenção de células tronco autólogas de medula óssea.....	23
2.4 Considerações anatomo-fisiológicas sobre o sistema nervoso.....	25
2.5 Lesões nervosas periféricas.....	28
2.6 Técnicas de reparação de nervos periféricos.....	30
2.7 Cicatrização dos nervos periféricos.....	33
2.7.1 Modificações na região proximal á lesão.....	34
2.7.2 Modificações no corpo celular.....	35
2.7.3 Modificações na região distal à lesão.....	36

2.7.4 Modificações no local da lesão.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Animais.....	39
3.2 Coleta de medula óssea.....	39
3.3 Separação e manipulação das células tronco autólogas de medula óssea...	41
3.4 Procedimento cirúrgico e transplante de células tronco autólogas de medula óssea.....	42
3.5 Processamento, análise das amostras e tratamento estatístico dos dados...	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5 CONCLUSÃO.....	64
6 REFERÊNCIAS.....	65
7 ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

As áreas ligadas à pesquisa em experimentação, no âmbito da medicina e biologia, vêm estudando as células tronco há mais de duas décadas (FILIP et al., 2004). No entanto, é nos dias de hoje que a terapia celular vive seu momento de máxima visibilidade, incitando a inquietante investigação científica e ocupando quase que diariamente o foco da imprensa do mundo inteiro. A grande atenção dispensada a esta unidade terapêutica, explica-se devido ao fato de muitas doenças, alvos potenciais desses tratamentos, constituírem-se nas principais causas de morte e morbidade da sociedade moderna (ZAGO & COVAS, 2006). Inseridas dentro deste contexto, encontram-se as variadas alterações e lesões do sistema nervoso periférico, que há bastante tempo vem sendo objeto de inúmeros estudos visando a compreensão e entendimento do processo de reparação nervosa, visto que estas alterações podem ocasionar transtornos importantes à função dos membros (GRECCO et al., 2003).

Lesões traumáticas vasculares, inflamações e neoplasias podem produzir ruptura de alguns ou todos os neurônios em um nervo periférico, resultando em disfunção sensitiva e/ou motora focal. Chrisman (1996) destacou que as causas mais comuns de disfunção aguda de nervos periféricos são, sem nenhuma dúvida, as lesões traumáticas.

A regeneração funcional que ocorre após uma reparação de secção nervosa é um processo bastante complexo que envolve tanto fatores locais quanto sistêmicos. Neste particular, os mecanismos básicos de controle da mielinização das fibras regeneradas e dos seus processos de crescimento e orientação encontram-se ainda parcialmente determinados (DAZA et al., 1999).

Estudos envolvendo a regeneração em defeitos nervosos conseguidos através do emprego de materiais biológicos e não biológicos como as câmaras de silicone e o envelope venoso cada vez mais vêm sendo desenvolvidos. No entanto, a capacidade de regeneração nervosa conseguida através desses materiais pode ainda ser melhorada na opinião de diversos autores (DOURADO et al., 2003; SILVA et al., 2006). Visando a superação das dificuldades na aplicação de técnicas reparadoras de nervos periféricos, pesquisas vêm objetivando conhecer o benefício da associação de técnicas já rotineiramente utilizadas, por apresentarem resultados

consolidados, com alternativas relativamente novas dentro do âmbito da engenharia tecidual. Como exemplo, podemos citar a utilização de substâncias exógenas administradas para promover um acréscimo na qualidade e velocidade de regeneração. No estudo em questão o emprego da técnica de tubulização associada à terapia celular mononuclear autóloga de medula óssea representa bem esta tendência.

A recente e promissora área da medicina regenerativa vem abrindo perspectivas inovadoras para o 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 et al., 2001; BARTH, 2006).

Considerando o exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de regeneração nervosa periférica, mais especificamente do nervo tibial de coelhos Nova Zelândia, mediante a associação da terapia celular por transplante de células tronco autólogas de medula óssea com a técnica de tubulização através de prótese de silicone. O delineamento experimental foi desenvolvido baseando-se na revisão de literatura realizada e na execução de projetos “piloto” de onde se puderam retirar algumas prévias conclusões a respeito desse tema ainda tão insuficientemente esclarecido. Devido ao fato das pesquisas nesta área e seus conseqüentes resultados ainda se encontrarem incipientes ou em fase de afirmação, muita dificuldade foi encontrada tanto no planejamento quanto na execução das diferentes etapas do estudo. Para tanto, o desenvolvimento de algumas técnicas e procedimentos baseados na tentativa e erro tornaram-se inevitáveis, pois ainda não se encontram disponíveis, consolidadas ou publicadas pelos pesquisadores dedicados à pesquisa com células tronco. Baseado nisso, torna-se importante salientar, que inúmeras pesquisas ainda serão necessárias para concluir ou confirmar achados de todos estes estudos que estão sendo hoje desenvolvidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste tópico serão abordados os principais itens que direcionarão e embasarão as discussões envolvendo a aplicação das células tronco de uma forma bastante ampla. Importância maior será dada à utilização de células tronco autólogas de medula óssea, tendo em vista que foi o tipo celular escolhido para o desenvolvimento desta pesquisa.

2.1 Terapia celular

Células, tecidos e órgãos lesados por doenças ou traumas podem ser recuperados espontaneamente pelo organismo saudável. A ocorrência deste processo em geral exige a interrupção ou abrandamento da agressão seguida de remodelação do tecido lesado, via de regra utilizando reservas de células tronco tecido específicas de que o organismo dispõe.

Neste contexto, Zago (2006a) conceituou o termo terapia celular como um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas fundamentadas no conhecimento de várias ciências que visam a utilização de células para tratamento de inúmeras doenças. Historicamente, a forma mais antiga de terapia celular conhecida é a transfusão de componentes sanguíneos de um indivíduo para outro, caracterizada por ser hoje em dia, uma das alternativas terapêuticas mais utilizadas no mundo inteiro.

Apenas exemplificando, o transplante de células tronco hematopoéticas (transplante de medula óssea) é atualmente a única forma de tratamento com células tronco humanas cuja aplicação faz parte do arsenal médico disponível. Todas as outras formas de tratamento derivadas dessa metodologia ainda encontram-se na fase experimental e, portanto, seus benefícios precisam ainda ser demonstrados ou consolidados, principalmente naqueles casos onde existam evidências marcantes e positivas de suas vantagens. Atualmente o principal foco de interesse da terapia celular é a medicina regenerativa, que objetiva a substituição de células e tecidos lesados, senescentes ou perdidos, por estruturas mais novas e funcionais, restaurando assim sua capacidade orgânica (ZAGO, 2006a).

Uma questão polêmica gerada e incorporada às pesquisas com células tronco é a fonte de onde elas são obtidas. Células tronco de origem embrionária, em particular a partir de um embrião humano, são cercadas por uma questão de cunho ético e até mesmo político que objetivam discutir a regulamentação da pesquisa e manipulação destas células. Este impasse surge a partir do princípio de utilização destes organismos, pois segundo Barth (2006), até o presente momento não existem meios de se obter células tronco embrionárias humanas que não exijam a produção e conseqüente destruição do embrião humano. Células tronco obtidas a partir de outras fontes, como organismos adultos, cordão umbilical e placenta, já não apresentam o mesmo entrave, pois não envolvem a manipulação de embriões. A abordagem que será desenvolvida nesta revisão bibliográfica trará informações relacionadas à coleta e manipulação de células tronco autólogas de medula óssea, que por serem obtidas a partir de organismos adultos, não fazem parte da discussão ética relacionada com as células tronco de origem embrionária.

2.2 Conceitos e fisiologia das células tronco

Células tronco são caracterizadas por serem células indiferenciadas, não apresentarem função específica nos tecidos e serem capazes de se proliferar mantendo-se no estado indiferenciado por longos períodos de tempo (tanto *in vitro* quanto *in vivo*). Esta última propriedade é denominada de auto-regeneração e permite que o compartimento de células tronco seja mantido constante ao longo do tempo (SANTOS, 2004; NARDI & ALFONSO, 2006). Células tronco apresentam também capacidade de se diferenciar em células maduras, demonstrando atividade funcional normal como a de outras células do tecido em que se localizam; a este processo denomina-se diferenciação (SANTOS et al., 2004). Em essência, células tronco de uma forma geral são capazes de realizar as chamadas “divisões assimétricas”, ou seja, podem originar células que permanecem indiferenciadas, repondo o *pool* de células tronco ou alternativamente podem se diferenciar em células especializadas (Figura 1) (ZAGO, 2006b).

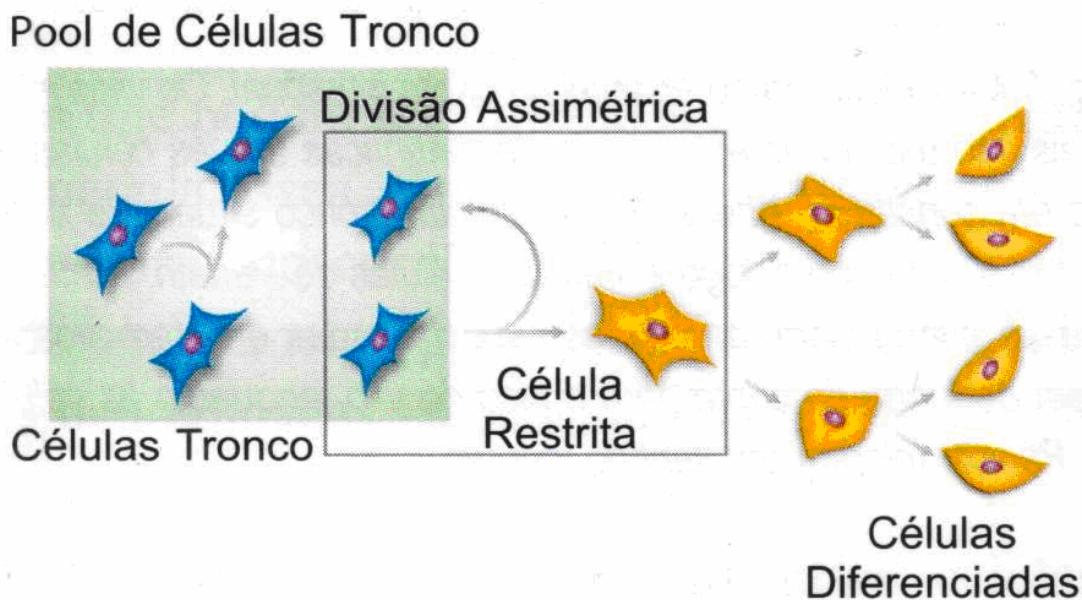


Figura 1- Representação esquemática da propriedade das células tronco de se dividirem dando origem a células que permanecem indiferenciadas ou células que se diferenciam e amadurecem. Fonte: Zago, 2006a.

Desde a década de 1940 sabia-se que na medula óssea existiam células indiferenciadas capazes de repor as células maduras do sangue. No entanto, o conceito de células tronco originou-se a partir dos estudos de Till e McCulloch que em 1961, demonstraram a reconstituição do sistema hematopoético de camundongos irradiados após o transplante de células da medula óssea de camundongos singênicos normais. Estes resultados indicaram a presença na medula óssea de células capazes de originar todos os tipos celulares sanguíneos (NARDI & ALFONSO, 2006). Devido a estes estudos preliminares, é que as primeiras células tronco bem caracterizadas foram as progenitoras das células sanguíneas. Essas células tronco, denominadas hematopoéticas (CTH), são bastante raras e devido a este fato, sua identificação morfológica sempre foi muito difícil (ZAGO, 2006a).

No organismo adulto, o processo de diferenciação hematopoética depende de interações entre as células tronco progenitoras e seu microambiente. Esse microambiente, é formado por células “fixas” (células do próprio tecido) e as células acessórias, como linfócitos e monócitos. Ambos os tipos celulares podem regular a hematopoese interagindo diretamente com as células tronco progenitoras ou

secretando as moléculas reguladoras que influenciam de uma maneira positiva ou negativa sua diferenciação. Além das citocinas, as células estromais produzem e secretam as macromoléculas que formam a complexa matriz extracelular (MEC). A MEC possibilita através da interação de seus componentes, a geração de uma estrutura tridimensional à qual as CTH aderem por receptores ou ligantes específicos (NARDI & ALFONSO, 2006).

A medula óssea (MO) contém uma grande diversidade de células que incluem: células maduras do sangue, linfócitos, fragmentos de estroma e gordura, além das células tronco hematopoéticas. As CTHs, dentre o grande número de células tronco de adultos atualmente conhecidas, ocupa a honrosa posição de ter sido a primeira descrita, sendo também a melhor compreendida e a mais amplamente aplicada em protocolos clínicos (NARDI & ALFONSO, 2006). Além desta variedade celular, na medula óssea existe ainda uma população rara de células tronco multipotenciais capazes de suportar a hematopoese e se diferenciar em diversas linhagens celulares. Estas células foram originalmente identificadas a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos por Alexander Friedenstein e colaboradores em 1966, que as denominaram células formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F, *colony forming units- fibroblastic*). Mais recentemente, estas células passaram a ser chamadas de células tronco mesenquimais (CTM). As CTMs correspondem a aproximadamente 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares. Podem ser facilmente isoladas a partir de aspirados de medula óssea, separando-se a fração mononuclear em gradiente de densidade, seguida de plaqueamento em concentrações variáveis. Em cultura, apresentam propriedade de se aderir à placa de cultivo e se propagar por mais de 15 passagens sem sinais de senescência. Estas células expressam um amplo espectro de citocinas, receptores de citocinas e fatores de crescimento. Também produzem uma série de moléculas de matriz extracelular incluindo fibronectina, laminina, colágenos e proteoglicanos (COVAS, 2006)

De acordo com o grau de diferenciação a que as células tronco podem se submeter, são classificadas em diferentes categorias. Células tronco totipotentes são as células que conseguem se diferenciar e originar todos os tecidos fetais. Como exemplo, pode-se mencionar uma célula-ovo, um óvulo fecundado ou uma célula híbrida obtida a partir da transferência de núcleo somático. Este tipo celular se encontra no ápice da hierarquia das células tronco. Células tronco pluripotentes

conseguem se diferenciar em todos os tipos teciduais de um indivíduo adulto com exceção das membranas embrionárias, placenta e anexos embrionários. Células tronco multipotentes são células isoladas de vários órgãos adultos auto-renováveis e diferenciadas em múltiplos tipos celulares de órgãos específicos. Finalmente, células com nenhum ou limitado poder de renovação e diferenciação em apenas um único e definido tipo celular são chamadas “células precursoras” ou “células progenitoras” (DEL CARLO, 2005; LAKSHMIPATHY & VERFAILLIE, 2005; ZAGO, 2006a;).

Atualmente existem numerosas demonstrações de que vários ou talvez todos tecidos humanos possuam células tronco como constituintes de reserva para repor as células maduras desgastadas. Por isso, tradicionalmente, células tronco adultas são consideradas pelo fato de produzirem células a partir do tecido de origem, mas não células de tecidos não relacionados (LAKSHMIPATHY & VERFAILLIE, 2005).

Desta forma, são bem conhecidas as células tronco da pele, mucosa intestinal, epitélio olfativo, cérebro, fígado, gordura, córnea, retina, polpa dentária, pulmões e músculos esquelético e cardíaco. Todos estes são exemplos de um tipo de célula tronco denominado de células tronco somática (soma=corpo). Como estas células podem dar origem a um único ou alguns poucos tipos de células diferenciadas, são classificadas como células tronco unipotentes, oligopotentes ou multipotentes (ZAGO, 2006b).

A capacidade de células tronco de um tecido de originar células diferenciadas maduras de outros tecidos vem sendo denominada de plasticidade. Uma questão chave ainda não respondida através dos estudos até então realizados, é o grau de plasticidade das células tronco adultas. Para Nardi & Alfonso (2006), uma das razões para que esta dúvida continue sem uma resposta definitiva é a dificuldade na experimentação envolvida. Enquanto se observa relativa facilidade de avaliar o potencial de diferenciação celular *in vitro*, o mesmo não acontece para a situação *in vivo*, pois o significado fisiológico e a correspondência destes processos é questionável.

Diante do exposto, a resposta final depende da avaliação de quanto um determinado tipo de célula tronco, após administração *in vivo*, pode originar tipos celulares de diferentes tecidos. Para se obter esta resposta, geralmente a metodologia dos estudos científicos envolve a administração de células juntamente com algum marcador para posterior avaliação da presença do mesmo. Além da

expressão deste marcador, considera-se necessária a determinação da identidade celular por análise morfológica, imunofenotípica e/ou funcional. Na opinião de Nardi & Alfonso (2006), a avaliação funcional demonstra significado muito importante, principalmente em tecidos mais complexos como nervoso, pois muitas vezes a determinação desta identidade apresenta-se incompleta.

Diferentes correntes explicam a teoria da plasticidade. Em algumas referências encontra-se a explicação para transformação de células da medula óssea em células diferenciadas de outros tecidos adultos na fusão celular. Diferentemente, outros estudos responsabilizam o fenômeno da transdiferenciação na geração de células diferenciadas maduras.

Em estudos *in vitro*, Alvarez-Dolado et al. (2003) observaram que as células derivadas da medula óssea fundiam-se espontaneamente com progenitores neurais. Já nas experimentações *in vivo*, fusão com hepatócitos e neurônios de Purkinje no cérebro e músculo cardíaco foi observada, resultando na formação de células multinucleadas. Utilizando modelos experimentais para doenças hepáticas, os autores observaram que o transplante de células da medula óssea de animais normais protegia os doentes e revertia o quadro de doença, provocando regeneração do órgão afetado. Posteriormente, observaram as células nos nódulos hepáticos em regeneração dos animais doentes e notaram a existência de marcadores biológicos das células do doador, cogitando a ocorrência de “transdiferenciação” de células de medula óssea em células hepáticas. No entanto, estudos subseqüentes demonstraram que estas células na verdade apresentavam tanto marcadores biológicos específicos do doador quanto do receptor, o que remetia à idéia de fusão celular das células de ambos os indivíduos.

Em suma, nos experimentos realizados por Alvarez-Dolado et al. (2003), nenhuma evidência de transdiferenciação foi observada. Apesar de existir considerável controvérsia na validade dos achados das pesquisas que trabalham nesta área, é importante tomar a posição de apoiar a continuidade destes estudos visando confirmar ou rejeitar a teoria da plasticidade de células tronco adultas.

2.3 Obtenção de células autólogas de medula óssea

Apesar da variedade de fontes passíveis de se obter células tronco somáticas, como por exemplo o sangue periférico, sangue da placenta ou cordão umbilical,

células tronco adultas cultivadas e tecido fetal, esta revisão abordará exclusivamente a coleta através da medula óssea.

A medula óssea de humanos e animais é composta por muitos constituintes celulares, dentre os quais existe uma fração de células mononucleares representadas principalmente pelas células tronco hematopoéticas, blastos, monócitos e linfócitos. Contém também uma rara população de células multipotenciais, as células tronco mesenquimais. Para que se possa realizar a purificação de células tronco hematopoéticas ou mesenquimais, ou ainda trabalhar clínica ou experimentalmente com a própria fração de células mononucleares, necessita-se realizar o procedimento de separação desta fração dos outros constituintes da medula óssea (FONTES et al. 2006).

Estes autores explicam de forma bastante clara e resumida o procedimento de separação da fração mononuclear, originalmente descrito por Boyum no ano de 1968. O objetivo do procedimento é a separação celular através do gradiente de Ficoll-Hypaque de densidade 1.077g/mL. A solução de Ficoll é constituída por uma mistura de polímeros de carboidratos Ficoll e composto iodado de metrizamida. Após centrifugação a baixa velocidade, as hemácias e os leucócitos granulócitos atravessam a fase orgânica (Ficoll-Hypaque) e sedimentam, as células mononucleares localizam-se na interface entre as duas soluções, enquanto as plaquetas e proteínas plasmáticas localizam-se na fase aquosa. Em geral, o procedimento inicia-se com diluição do sangue em solução salina tamponada (*phosphate buffer saline* - PBS), o qual é transferido para tubo cônico tipo Falcon. Em seguida é adicionada vagarosamente a solução de gradiente Ficoll-Hypaque ao fundo do tubo. A separação de células sanguíneas ocorre à temperatura ambiente e após centrifugação a 700g por 30 minutos. Após esse processo, observa-se um anel celular na interface entre as fases orgânica (Ficoll-Hypaque, fase inferior) e aquosa (fase superior), onde estão presentes as células mononucleares. Desta forma, as células da interface são coletadas cuidadosamente com uma pipeta de Pasteur, transferidas para outro tubo, submetidas à lavagem em salina e em seguida ressuspensas em pequeno volume de PBS para posterior contagem em câmara de Neubauer. Todo esse processo realizado com a fração total de medula óssea, objetivando a separação da porção mononuclear, encontra-se ilustrado na Figura 2.

2.4 Considerações anatomo-fisiológicas sobre o sistema nervoso

O sistema nervoso de uma forma geral pode ser dividido em dois sistemas fundamentais: o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP). O SNP é constituído pelos nervos periféricos cujos corpos celulares se encontram no SNC, pelos gânglios periféricos e seus nervos (da raiz dorsal e dos pares cranianos), plexos e células neuro-endócrinas. Todas as estruturas exclusivas do SNP tem origem a partir da crista neural. Nos gânglios periféricos existem neurônios, células de Schwann e células satélites.

Os nervos periféricos são formados por axônios, células não neurais e componentes da matriz extracelular (MEC). O axônio juntamente com sua bainha de mielina denomina-se fibra nervosa, representando a unidade básica do sistema nervoso periférico e constituindo-se em uma extensão do corpo celular nervoso situado na medula espinhal ou em suas proximidades (SHORES, 1996; PIERUCCI, 2004).

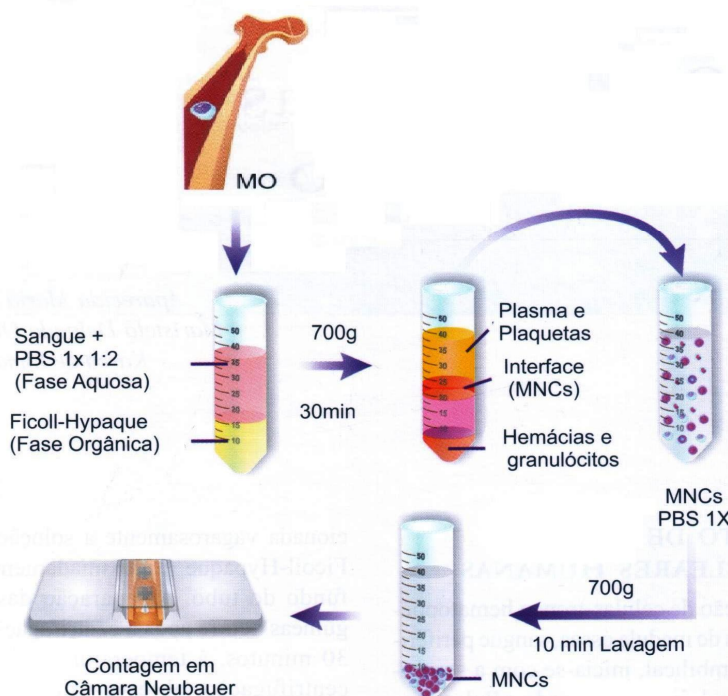


Figura 2- Representação esquemática do procedimento de isolamento da porção mononuclear a partir de fração total de medula óssea (MO). Fonte: Fontes et al., 2006.

Os axônios apresentam axoplasma fluido no interior da membrana celular e podem apresentar-se mielinizados ou não mielinizados. Esse sistema tem a função de receber estímulos e os traduzir na forma de potenciais de ação transmitindo estas informações para o SNC (RODKEY, 1998; HIATT & GARTNER, 1997).

Dentre os componentes da MEC podemos citar o colágeno (COL), a fibronectina (FN) e a laminina (LAM), presentes no nervo e também reorganizados após a lesão. Esses componentes desenvolvem um papel fundamental no processo regenerativo nervoso, auxiliando o brotamento axonal que cresce do coto proximal em direção ao coto distal. Neste processo, os macrófagos presentes no nervo iniciam a fagocitose dos elementos em degeneração. No início os macrófagos sintetizam e liberam interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), as quais atuam como agentes quimiotáticos para as células de Schwann. Estas por sua vez, sintetizam compostos fundamentais para o processo regenerativo, dentre eles os fatores neurotróficos (PIERUCCI, 2004; VIOTT, 2006).

Viott (2006) destacou que as células de Schwann são exclusivamente encontradas no SNP e apenas em situações especiais podem ser vistas no SNC. São células extremamente lábeis, desempenhando um papel crucial na formação dos nervos. Auxiliam o SNC e periférico nos processos regenerativos, além de possuir a função de mielinizar ou envolver axônios do SNP (MIRSKY & JESSEN, 2001). As áreas juncionais existentes entre as células de Schwann são denominadas nodos de Ranvier e encontram-se localizadas em pequenos intervalos, sem mielina, ao longo de cada axônio mielinizado. A mielina de cada um destes axônios é formada a partir da membrana plasmática da célula de Schwann, enrolada múltiplas vezes ao redor do axônio (TOOP & BOYD, 2006). Nas fibras mielinizadas o potencial de ação salta de um nodo de Ranvier para o seguinte, resultando em rápida velocidade de condução. Em axônios não mielinizados, a velocidade é mais lenta, pois o potencial de ação é contínuo ao longo de toda extensão da fibra nervosa (RODKEY, 1998).

Observando a anatomia transecional do nervo periférico (Figura 3), pode-se visualizar melhor o descrito anteriormente sobre a histofisiologia nervosa.

Cada nervo contém grupos múltiplos de axônios dispostos em três camadas de tecido conjuntivo. Circundando as fibras nervosas e apresentando-se como a camada mais externa encontra-se o epineuro, formado de tecido conjuntivo frouxo com fibras de colágeno tipo I, vasos e fibroblastos. A camada média de tecido conjuntivo, denominada de perineuro, apresenta células pavimentosas fortemente unidas por junções íntimas e dispostas em camadas concêntricas em relação às fibras nervosas. Entre as sucessivas camadas celulares são encontradas fibras de COL tipo I e tipo III. Esta camada é importante na manutenção da homeostase do nervo, pois atua como uma barreira seletiva no trânsito de substâncias com alto peso molecular. A camada mais interna de tecido conjuntivo é denominada endoneuro, apresentando íntimo contato com as fibras nervosas. O endoneuro é composto por fibroblastos e fibras de colágeno III do tipo reticular dispostas longitudinalmente em relação à fibra nervosa, vasos sanguíneos, barreira nervo sangue e mastócitos. Nesse tecido conjuntivo podem residir macrófagos, poucos fibroblastos dispersos ao acaso e eventualmente mastócitos (SHORES, 1996; SEIM III, 2005; TOPP & BOYD, 2006).

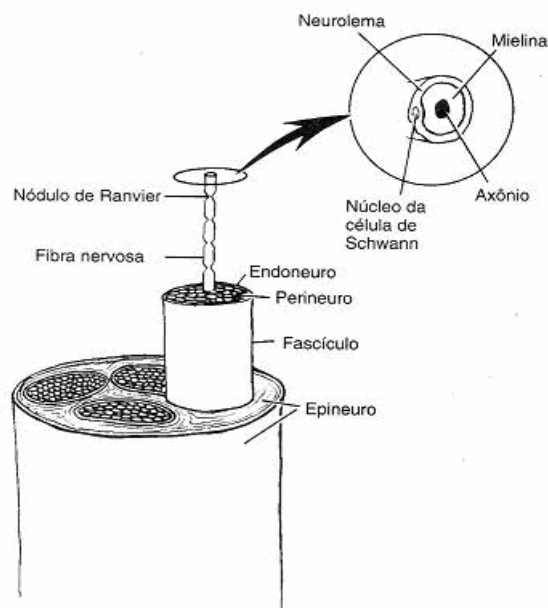


Figura 3- Representação esquemática das estruturas nervosas microscópicas demonstradas em corte transecional esquemático de nervo periférico. Observar a disposição e ordenamento dos feixes e fascículos nervosos. Fonte: Shores, 1996.

O nervo periférico possui um sistema microvascular bem desenvolvido no epineuro, perineuro e endoneuro. Seus vasos encontram-se distribuídos em várias camadas no nervo que são interligadas através de várias anastomoses. O sistema microvascular possui uma grande capacidade de reserva para compensar a mobilização ou lesão dos vasos regionais locais. No epineuro, vasos orientados longitudinalmente exibem um padrão característico, ou seja, os vasos estão presentes em todas as camadas epineurais, bem como entre os feixes fasciculares e camadas profundas do nervo. A importância da vascularização dos nervos periféricos se deve ao fato dos axônios dos nervos periféricos serem vulneráveis a isquemia pela grande distância que existe entre o corpo neuronal e a extensão do axônio (PACHIONI, 2006).

O suprimento sanguíneo para os nervos periféricos se origina a partir de veias e artérias vizinhas de grande calibre, bem como dos vasos periosteais e musculares adjacentes. Os ramos desses vasos dividem-se em ascendentes e descendentes e quando alcançam o epineuro anastomosam-se com o sistema intrínseco. Esse sistema é composto por plexos epineurais, perineurais e endoneurais juntamente com seus vasos comunicantes (SHORES, 1996).

Dentre as estruturas nervosas do organismo, o nervo ciático ou isquiático apresenta-se como o maior nervo em diâmetro do corpo. É um nervo misto (sensitivo e motor) formado pelas raízes ventrais de L6-S1 e emerge da pelve através do forame isquiático maior, continuando seu trajeto descendo entre o trocânter maior do fêmur e a tuberosidade isquiática e ao longo da face dorsal da coxa, cranial aos músculos bíceps femoral e semitendinoso. Segue até seu terço distal onde se divide em dois grandes ramos denominados nervos fibular e tibial comum (FONSECA, 2002), sendo que este último inerva os músculos flexores da soldra e do jarrete (gastrocnêmio e flexores superficiais e profundos dos dedos) (CHRISMAN, 1996; FOSSUM, 2005).

2.5 Lesões nervosas periféricas

Lesões em nervos periféricos são comuns e ocorrem mais frequentemente como resultado de traumatismo, tais como contusões, fraturas, ferimentos por projéteis, mordidas, lacerações e injeção de agentes no interior ou arredores de um determinado nervo (RODKEY, 1998; NELSON & COUTO, 2001; SEIM III, 2005).

Os nervos radial e ciático, por exemplo, são as estruturas mais comumente lesionadas resultando em disfunção bastante significativa de extremidades. As causas mais comuns de lesão ao nervo ciático, e por consequência suas ramificações, são as fraturas do corpo ilíaco, as lesões iatrogênicas decorrentes da cirurgia do fêmur proximal, do quadril, reparo de hérnia perineal e o aprisionamento nervoso secundário à aplicação de pino intramedular como método de fixação de fraturas femorais (SEIM III, 2005).

Experimentalmente, diversos procedimentos vêm sendo usados para estudar a regeneração nervosa periférica do nervo ciático e suas ramificações. Dentre estes se ressaltam as lesões por esmagamento através de compressão, transecção, ressecção, estiramento e congelamento (BLOCH, 2001; PACHIONI, 2006). A ocorrência de lesão de um nervo periférico resulta em alterações significantes e complexas nos segmentos proximal e distal do nervo periférico, no corpo celular, no local de lesão, bem como no órgão-alvo (ROWSHAN et al., 2004; MARTINS et al., 2005).

Dourado et al. (2003) classificaram as lesões nervosas periféricas em três tipos principais. Desta forma, existe neuropraxia quando há interrupção da condução nervosa devido à lesão da bainha de mielina do nervo. Já a axonotmese, é caracterizada pela perda de continuidade do axônio, porém com a membrana epineural intacta. Finalmente, neurotmese ocorre quando há o rompimento completo do nervo, sendo este o tipo mais grave de lesão.

Os distúrbios dos nervos periféricos caracterizam-se clinicamente por um grupo de sinais conhecidos como síndrome neuropática. Esses sinais são comumente observados na prática clínica veterinária e estão frequentemente associados ao traumatismo de nervos periféricos. Fazem parte desta síndrome, os reflexos reduzidos ou ausentes (hiporreflexia ou arreflexia), tono muscular reduzido ou ausente (hipotonia, atonia ou flacidez) debilidade (paresia) ou paralisia dos músculos dos membros e ou cabeça e, após uma a duas semanas, atrofia muscular

neurogênica. Esses sinais podem ser ocasionados por lesões tanto do corpo celular como dos axônios (BRAUND, 1997; GARIBALDI, 2003).

Diante de um traumatismo em um nervo periférico, pode-se recorrer a testes eletrodiagnósticos, quando disponíveis, para se avaliar mais especificamente a extensão da lesão neuronal (NELSON & COUTO, 2001). Quando esta avaliação não é possível, alguns procedimentos técnicos específicos são realizados visando se conhecer as respostas que permitirão observar a integração dos sistemas nervoso central e periférico. Para indução específica do reflexo gastrocnêmico, que é mediado pelo nervo tibial (vias aferente e eferente), Garibaldi (2003) indicou a percussão do tendão proximal ao calcanhar com o tarso moderadamente flexionado, objetivando obter como resposta a extensão do tarso. No entanto, na opinião do próprio autor, este não consiste de um teste muito confiável quando comparado à observação da resposta ao estímulo de outros nervos e portanto deve-se ter cuidado ao avaliá-lo. Para ele, é importante não confundir o movimento resultante da percussão tendínea com a atividade reflexa, o que muitas vezes não é uma tarefa fácil.

2.6 Técnicas de reparação de nervos periféricos

Neste tópico será dada maior importância para a técnica de tubulização no reparo de nervos periféricos, tendo em vista o aprofundamento no tema proposto e o cuidado em abordar aspectos ligados ao desenvolvimento deste estudo, procurando não tangenciar o assunto nem discutir em demasiado as outras técnicas possíveis de serem empregadas.

O trauma por transecção de um nervo periférico invariavelmente resulta na perda de função do órgão inervado. Esta estrutura quando lesada raramente apresenta recuperação sem a intervenção cirúrgica para reparo nervoso periférico (OLIVEIRA et al., 2004). Devido a este fato, para Martins et al. (2005), na grande maioria das vezes a intervenção cirúrgica torna-se a única opção terapêutica aplicável.

A literatura especializada cita numerosas técnicas cirúrgicas passíveis de serem empregadas para reparação nervosa periférica. Dentre elas ressalta-se a neurografia epineural, a neurografia fascicular, a neurografia epineural-fascicular combinada, os enxertos nervosos (SHORES, 1996), a sutura em padrão axial central

(CONTESINI et al., 1992), a aplicação de adesivos de fibrina, a aplicação de laser de CO₂ (DOURADO et al., 2003) e as técnicas de tubulização com câmaras constituídas a partir de diferentes materiais (ELY & CALTEUX, 1983; LABRADOR et al., 1998; STOPIGLIA et al., 1998; DAZA et al., 1999; MELLO et al., 2001; PINEDO et al., 2001; ALLET et al., 2003; DOURADO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; DELISTOIANOV et al., 2006;).

Estudos envolvendo reparação e cicatrização de nervos periféricos datam de muito tempo. De acordo com Grecco et al. (2003), o método de sutura epineural foi descrito primeiramente por Heuter em 1873 e o primeiro enxerto nervoso experimental por Philipeau e Vulpian em 1886. Ainda mais tardiamente, graças ao aperfeiçoamento e conseqüente evolução de técnicas e materiais microcirúrgicos, é que se conseguiu um avanço e um aperfeiçoamento na reconstrução das estruturas nervosas lesadas com nítida melhora da recuperação funcional.

Na opinião de Pinedo et al. (2001) as técnicas cirúrgicas aceitas tradicionalmente para reparação nervosa como as neurorrafias, alongações e enxertos resultaram em escassa aplicação na rotina devido às limitações de seus resultados. Para Torres et al. (2003), o emprego de suturas epineurais e perineurais vem sendo questionado devido à maior possibilidade de dano ao tecido neural com o material de sutura e como conseqüência resultando na formação de granulomas. Na opinião deste autor essas técnicas evidenciam compressão pelo fio de sutura e mau direcionamento do tecido endoneural nos exames histopatológicos.

Há casos em que, apesar da grande capacidade regenerativa do SNP, a extensão da lesão impossibilita a simples reunião dos cotos. Uma técnica de reparo empregada nessa situação é a tubulização, que pode ser otimizada com acréscimo de fatores neurotróficos, componentes da matriz extracelular ou componentes celulares como as células de Schwann, aumentando assim a eficiência do processo regenerativo (PACHIONI et al., 2006). Esta técnica, também chamada entubulação, é um procedimento cirúrgico em que os cotos nervosos seccionados são introduzidos e fixados dentro de uma prótese tubular, objetivando propiciar um ambiente favorável à regeneração. Proporciona ainda o direcionamento do crescimento nervoso das extremidades rompidas ou seccionadas (OLIVEIRA et al., 2004) protegendo as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitando a formação de neuromas (PIERUCCI, 2004).

Avanços na reparação de nervos periféricos em substituição a implantes de aloenxertos e autoenxertos têm sido conseguidos através da técnica de tubulização (PINEDO et al., 2001). Numerosas referências relatam a utilização de diferentes materiais para a confecção da câmara de tubulização, dentre eles pode-se citar o uso do silicone (CONTESINI et al., 1992; DAZA et al., 1999), da celulose liofilizada (MELLO et al., 2001), dos adesivos de fibrina (CHEM & CHEM, 2004), dos envelopes venosos (ELY & CATEUX, 1983; ALLET et al., 2003) e de outros materiais biológicos como a quitosana por exemplo (PINEDO et al., 2001). Oliveira et al. (2004) citaram também a utilização rotineira dos tubos de ácido poliglicólico no reparo de nervos mediano, ulnar e digitais em humanos.

No passado, esses condutos de origem biológica como as artérias, veias, osso descalcificado, dura-máter e peritônio foram bastante estudados. No entanto, falharam em propiciar um bom mecanismo de suporte que guiasse o crescimento axonal e apresentaram dificuldades adicionais como a necessidade de lesionar outras áreas do corpo para se obter o conduto e encontrar o diâmetro adequado para se proceder o reparo nervoso (OLIVEIRA et al., 2004). Segundo este último autor, o material usado como conduto deve satisfazer uma variedade de critérios. A substância escolhida deve ser biocompatível para não induzir resposta imune vigorosa que possa interferir com o processo de regeneração. O material deve permanecer o menor tempo possível necessário para completar a regeneração nervosa e fornecer sustentação para guiar o crescimento axonal de forma adequada. Deve estimular a migração de células, a vascularização e o acúmulo de fatores neurotróficos entre os cotos e desse modo aumentar a velocidade de regeneração. Sob o ponto de vista cirúrgico deve ainda ser flexível e apresentar a parede o mais fina e transparente possível, facilitando o procedimento de fixação e a orientação dos cotos.

A regeneração através da prótese tubular está na dependência da formação precoce de uma ponte não celular conectando as duas extremidades nervosas (Figura 4). Esta conexão consiste de uma matriz de fibrina que provém substrato inicial para migração de células não neuronais (OLIVEIRA et al., 2004; PIERUCCI, 2004).

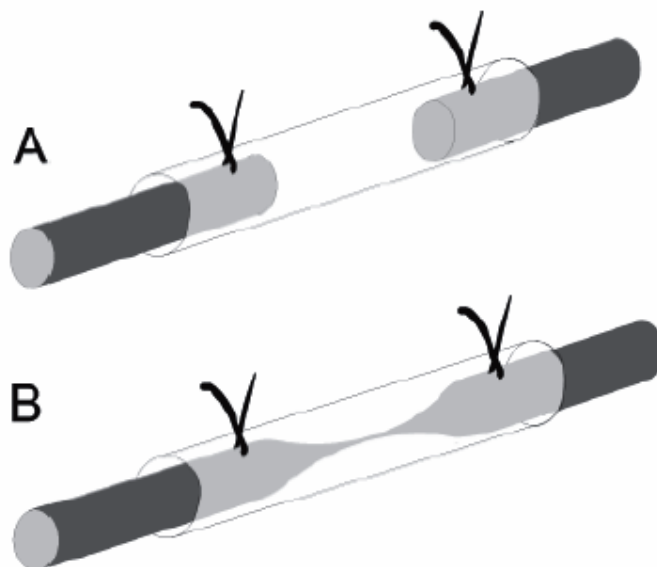


Figura 4- Representação esquemática de A) técnica de tubulização para reparo de secção nervosa. B) formação da ponte não celular entre as extremidades nervosas. Fonte: Oliveira et al., 2004.

A matriz de fibrina é posteriormente degradada e substituída por fibrilas de colágeno de orientação longitudinal que servirão de substrato para o brotamento de regeneração a partir da extremidade proximal. A ocorrência destes eventos fica na dependência do tamanho do espaço entre os cotos nervosos e da dimensão da área de secção transversal do tubo (OLIVEIRA et al., 2004). Estudando a regeneração do nervo ciático de camundongos pelo processo de tubulização com prótese de silicone, aplicada em defeitos de tamanhos crescentes de 2, 4, 6 e 8 mm, Buti et al. (1996) observaram melhora muito significativa dos reparos realizados em pequenos espaços (2 e 4 mm). No entanto, a melhora obtida com o processo de tubulização não foi tão marcante com os intervalos maiores (6 e 8 mm).

2.7 Cicatrização dos nervos periféricos

O traumatismo por secção de um nervo acarreta modificações no corpo celular, nos segmentos proximal e distal à lesão, no próprio local de lesão e nos órgãos inervados pelo referido nervo (MARTINS et al., 2005). No processo de

regeneração do axônio lesado e seu retorno à função normal, estão envolvidos vários fatores, dentre os quais se destacam a distância entre o local de lesão e o órgão final, o mecanismo gerador do trauma, a duração do intervalo entre a lesão e o reparo cirúrgico, a idade e a condição geral do paciente e a técnica cirúrgica empregada no reparo (SEIM III, 2005). Ainda estão relacionados fatores como a formação de neuromas, a extensão da lesão, o espaço criado entre os cotos nervosos (“gap” nervoso) e os fatores tróficos (DOURADO et al., 2003). É de vital importância o cuidado com o alinhamento anatômico das extremidades nervosas e a atenção a detalhes cirúrgicos, assegurando que os axônios em regeneração encontrem seu caminho ao longo do tubo neurilematoso até seu órgão final, resultando em uma boa recuperação funcional. Com relação à natureza ou mecanismo gerador do trauma, pode-se observar que lacerações agudas e limpas geralmente recuperam-se melhor e mais rapidamente que lesões por avulsão, esmagamento, abertas e/ou crônicas (SEIM III, 2005). Existe uma variabilidade bastante grande na literatura especializada quanto a velocidade de crescimento nervoso. Almeida (2006), referiu que o processo de regeneração em humanos ocorre a uma taxa de 1mm/dia. No entanto outros autores como Seim III (2005) relataram uma velocidade de regeneração nervosa em pequenos animais de até 4mm/dia.

A seguir serão descritos detalhadamente os principais eventos que ocorrem nas diferentes regiões envolvidas com o trauma em um determinado nervo periférico.

2.7.1 Modificações na região proximal a lesão

Proximalmente à lesão, os axônios sofrem um processo de degeneração semelhante ao que ocorre no coto distal, porém geralmente estendendo-se apenas até o nódulo de Ranvier mais próximo (MARTINS et al., 2005). Na porção distal do coto proximal, devido ao transporte anterógrado de moléculas sinápticas e estruturais do citoesqueleto, observa-se um acúmulo de material citoplasmático (ZOCHODNE, 2000), que segundo Terenghi (1999), pode vazar em virtude do rompimento da membrana celular desses axônios.

Todas as células do organismo necessitam de fatores tróficos para sobreviver, prevenindo a apoptose celular. Fator neurotrófico é a substância que regula e

mantém a função do neurônio promovendo seu crescimento. No processo de regeneração nervosa, receptores específicos são expressos em maior quantidade na região do cone de crescimento, aos quais se unem fatores neurotróficos específicos. Esses fatores são transportados retrogradamente ao corpo celular e atuam modulando a interação entre enzimas denominadas caspases e proteínas pró-apoptóticas mediante a ocorrência de reações de fosforilação. Consequentemente, é a inibição dessas enzimas, consideradas as principais efectoras da morte celular, que possibilitarão a manutenção da fisiologia normal da célula. Geralmente, os fatores neurotróficos exercem seus efeitos diretamente sobre o metabolismo celular, no entanto, outra forma destes fatores atuarem neste mecanismo é indiretamente, pela ação no metabolismo de células de suporte, cujo representante principal é a célula de Schwann (MARTINS et al., 2005).

Várias substâncias que são produzidas no local da lesão atuam como fatores neurotróficos, dentre as quais destacam-se o *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), o *nerve growth factor* (NGF), o *glial cell line derived neurotrophic factor* (GDNF), o *ciliar neurotrophic factor* (CNF) (ZOCHODNE, 2000), o *transforming growth factor- β* (TGF- β), o *insulin-like growth factor* (IGF), o *platelet-derived growth factor* (PGF) e as neurotrofinas (NF) (MARTINS et al., 2005).

O padrão de produção de NGF alcança sua concentração máxima rapidamente 24 horas após o estabelecimento de uma lesão nervosa. Com relação ao BDNF, sua produção inicia-se um pouco mais tardiamente, cerca de quatro dias após uma axonotomia, apresentando sua concentração máxima em quatro semanas após a lesão. O BDNF é mais eficaz em promover a sobrevivência de axônios motores em crescimento, em comparação a manutenção da sobrevivência dos neurônios sensoriais e simpáticos. Desta forma, esses dois fatores neurotróficos exercem suas atividades de maneira complementar, o que também provavelmente se repita com outros fatores no processo de regeneração (MARTINS et al., 2005).

2.7.2 Modificações no corpo celular

Logo nas primeiras horas após a lesão axonal o corpo celular apresenta algumas modificações chamadas de cromatólise, que se caracterizam histologicamente por ingurgitamento da célula, desintegração da substância de Nissl e migração nuclear do centro para a periferia (PIERUCCI, 2004). As alterações

presentes no corpo celular são interpretadas como um incremento do metabolismo celular visando produção de proteínas relacionadas à regeneração do citoesqueleto axonal em detrimento da produção de neurotransmissores. Essas proteínas, representadas principalmente pela actina e tubulina, estão relacionadas ao transporte intracelular e a movimentação do cone de crescimento (MARTINS et al., 2005).

2.7.3 Modificações na região distal a lesão

As alterações que ocorrem na extremidade distal do axônio iniciam com a degeneração axonal, denominada de degeneração Walleriana (FENRICH & GORDON, 2004). Durante este evento, o citoesqueleto e o axoplasma se degeneram deixando o correspondente tubo endoneural vazio. A destruição da bainha de mielina estimula a atividade dos macrófagos e células de Schwann resultando na remoção da maioria dos seus fragmentos. As células de Schwann desempenham importância fundamental na regeneração, atuando como condutores físicos que possibilitam o direcionamento dos axônios durante o crescimento em direção ao órgão-alvo. Essas células ainda apresentam a propriedade de produzir elementos da matriz extracelular como proteoglicanas, colágeno e fatores neurotróficos (PIERUCCI, 2004; MARTINS et al., 2005).

A regeneração que ocorre no sistema nervoso periférico está diretamente relacionada à possibilidade de manutenção das células de Schwann independentemente da degeneração do axônio. Essa sobrevivência, que pode atingir meses no coto distal de animais submetidos à axoniotomia, ocorre pela existência de uma série de sinais celulares produzidos pelas próprias células de Schwann independente do contato com os axônios (MARTINS et al., 2005).

2.7.4 Modificações no local da lesão

Nervos periféricos que sofrem lesão suficiente para causar axonotmese e neurotmese sofrem degeneração imediatamente no local de lesão. Este evento pode ser observado já nas primeiras 24 horas após a lesão (SEIM III, 2005). Ao rompimento do nervo, a primeira nítida alteração que se observa é a retração do mesmo (PIERUCCI, 2004). O intervalo formado entre os cotos é preenchido por

sangue formando-se um coágulo de fibrina. Na extremidade do coto proximal, os axônios formam protrusões axoplasmáticas que são denominadas de brotos de crescimento. Por este processo, cada axônio pode originar vários outros axônios delimitados pelo perineuro. Este brotamento axonal está presente precocemente, podendo ser observado em apenas três horas após a ocorrência da lesão nervosa (MARTINS et al., 2005).

Logo após a formação dos brotamentos axonais observa-se um aumento na presença de mitocôndrias e vesículas e estas estruturas passam a ser denominadas cones de crescimento. Um cone de crescimento possui marcadamente duas porções: a região do lamelipódio e os filopódios (Figura 5).

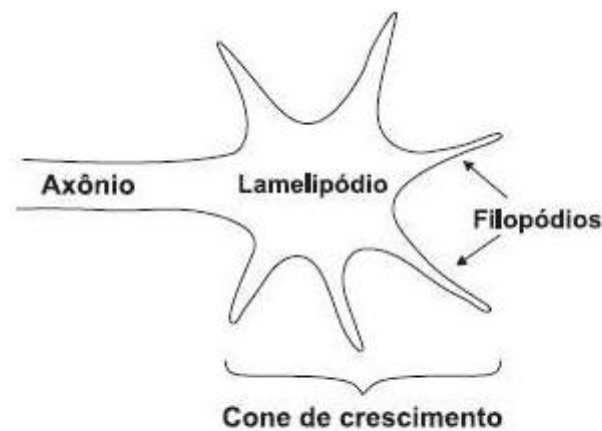


Figura 5- Representação esquemática da extremidade do axônio e seu cone de crescimento. Observar a presença dos lamelipódios e filopódios. Fonte: Martins et al., 2005.

A região do lamelipódio é definida como a área central da extremidade do cone, apresentando constante remodelamento pela formação e retração dos filopódios. Os filopódios por sua vez, caracterizam-se por expansões em forma de espículas que se estendem e se retraem a partir da superfície do lamelipódio, movimentados pela contração dos filamentos de actina e formando uma rede poligonal complexa no seu interior. Por meio desta disposição, o cone de crescimento atua de forma semelhante ao movimento amebiano, explorando o

microambiente extracelular até que pela interação de receptores de superfície com estímulos adequados, tais como fatores de crescimento, haja uma reorientação apropriada que possibilite o crescimento axonal em direção ao coto distal e órgão-alvo (MARTINS et al., 2005).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

No desenvolvimento do estudo foram utilizados 12 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) raça Nova Zelândia albinos, de ambos os sexos (6 machos e 6 fêmeas), com aproximadamente cinco meses de idade, pesando entre 1,8 e 2,5kg (média de 2,1kg) provenientes da Escola Técnica Agrícola (ETA) de Viamão-RS. Após período de adaptação às condições ambientais, os animais foram albergados, operados e mantidos durante o período pós-operatório na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As dependências da referida instituição dispõem de salas com temperatura controlada (18 a 20°C), gaiolas individuais específicas para coelhos e alimentação baseada em ração comercial peletizada e água *ad libitum*.

3.2 Coleta de medula óssea

Para se realizar a coleta das células tronco autólogas de medula óssea, optou-se pela extração a partir do tubérculo maior do úmero, em ambos os membros, utilizando-se agulha de Osgood¹ (25x10) acoplada à seringa de 10mL previamente heparinizada (Figura 6). Neste procedimento submeteu-se o animal a decúbito lateral e através da flexão da articulação escápulo-umeral procedeu-se a penetração da agulha em movimentos rotacionais. Para realização deste procedimento aplicou-se cetamina² (40mg.kg⁻¹), midazolan³ (2mg.kg⁻¹) e citrato de fentanila⁴ (0,8µg.kg⁻¹), todos por via intramuscular. A manutenção do plano anestésico foi feita com a administração de oxigênio a 100% (2 L/min) e isoflurano⁵ em vaporizador universal aplicado através de máscara facial.

¹ B-D, Becton e Dickinson Ind. Cirúrgicas S/A, São Paulo, SP, Brasil.

² Ketamina – Agener União Química Farmacêutica Nacional, SP, Brasil.

³ Dormire – Cristália, Itapira, SP, Brasil.

⁴ Fentanest – Cristália, Itapira, SP, Brasil.

⁵ Isoforine - Cristália, Itapira, SP, Brasil.

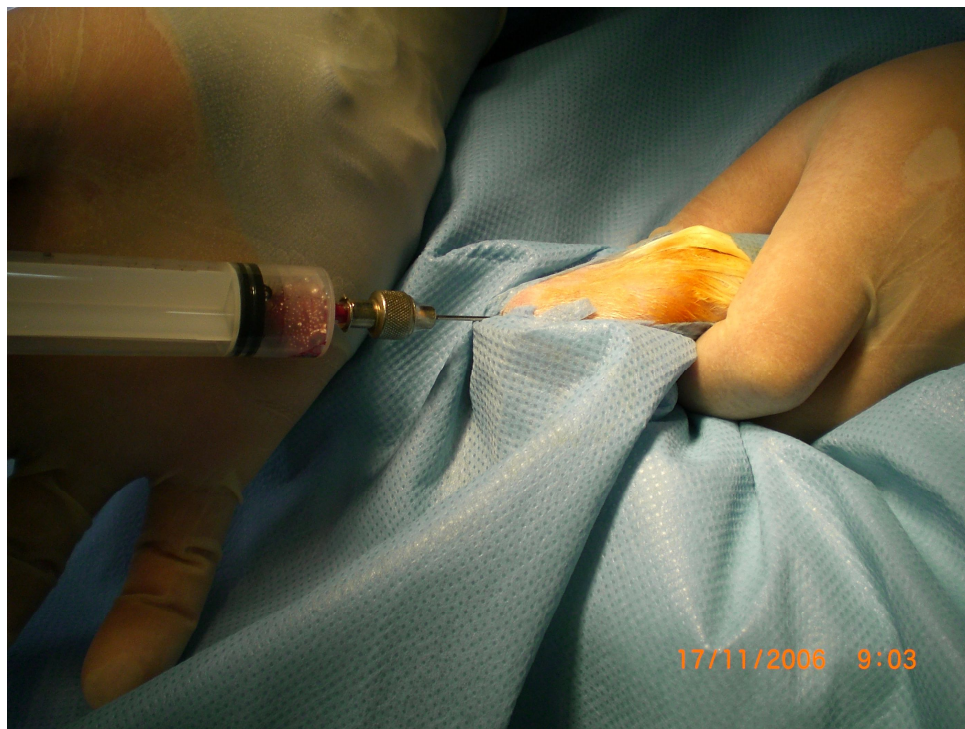


Figura 6 – Fotografia demonstrando a coleta de medula óssea a partir do tubérculo maior do úmero utilizando-se agulha de Osgood (25x10) acoplada à seringa de 10 mL previamente heparinizada.

As coletas foram realizadas no turno da manhã de forma seriada, sendo que todas as amostras foram manipuladas individualmente mas no mesmo tempo de processamento. O tempo de execução do protocolo anestésico e da técnica de coleta conjuntamente foi de aproximadamente 30 minutos para cada animal. Após serem obtidas as frações de medula óssea, as mesmas foram imediatamente acondicionadas em tubos Falcon de 15mL e encaminhadas, sob refrigeração, ao Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para proceder-se a separação da fração mononuclear. A fração total de medula óssea coletada de ambos os membros de cada animal variou entre 0,95 e 2,20 mL. Na tabela 1, encontra-se de forma individualizada o volume total de medula óssea aspirada a partir do tubérculo maior do úmero em cada animal.

Tabela 1- Volume de medula óssea aspirada a partir do tubérculo umeral direito (UD) e esquerdo (UE) para posterior processamento e separação da fração mononuclear.

Identificação	Sexo	Volume (mL)		Volume total (mL)
		UD	UE	
01	F	0,80	0,90	1,70
02	F	0,60	1,00	1,60
03	M	0,25	0,70	0,95
04	F	0,80	1,40	2,20
05	M	1,00	1,00	2,00
06	M	1,00	0,90	1,90
07	F	1,60	1,00	2,60
08	F	0,50	1,50	2,00
09	M	2,10	2,00	4,10
10	M	1,20	1,60	2,80
11	F	1,00	1,50	2,50
12	M	2,00	1,70	3,70

3.3 Separação e manipulação das células tronco autólogas de medula óssea

O aspirado total de medula óssea de cada animal foi processado com Ficoll⁶ densidade 1.077g/mL objetivando separar a fração celular mononuclear do restante dos constituintes da fração total de medula óssea. Inicialmente o aspirado medular foi homogeneizado e lavado duas vezes utilizando-se meio de cultura D-MEM com 1% de penicilina. A suspensão celular foi então centrifugada⁷ por 5 minutos a 2000 rpm.

Após a centrifugação, o pellet de células resultante foi ressuscitado em 3 mL de meio D-MEM. Em um novo tubo Falcon foi adicionado 3mL de Ficoll na proporção de 1:1 e a suspensão celular foi adicionada pela parede do tubo, evitando

⁶ Histopaque 1077 – Sigma Aldrich, St. Louis, EUA.

⁷ Refrigerated Multipurpose Centrifuge 5804 R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.

desta forma a mistura das frações. As células foram centrifugadas por 20 minutos a uma velocidade de 1500rpm e a uma temperatura de 18°C. As células mononucleares ficaram localizadas na interface criada com a centrifugação formando um halo levemente mais denso.

Após ser retirada esta fração (localizada na interface), foi colocada em um novo tubo Falcon sendo centrifugada por mais 5 minutos a uma velocidade de 2000 rpm. Finalmente, o pellet celular foi ainda ressuspendido em 1mL de meio D-MEM e esta suspensão celular foi posteriormente incubada em estufa a 5% de CO₂ e umidificada durante 20 minutos. Após o período de incubação a suspensão celular foi lavada uma única vez com 5 mL de PBS e centrifugada por 5 minutos a 2000rpm. O pellet celular foi ressuspendido em 1mL de PBS e então as células foram quantificadas e avaliadas quanto a sua viabilidade pelo emprego do azul de Trypan. Um total de 1.10⁶ células em um volume de 0,1mL foi transplantada à prótese de silicone fixada ao nervo tibial esquerdo previamente transecionado. O tempo total de processamento celular das frações coletadas foi de aproximadamente 1 hora e 50 minutos.

3.4 Procedimento cirúrgico e transplante das células tronco autólogas de medula óssea

No período da tarde, imediatamente após manipulação das frações celulares mononucleares a serem inoculadas em cada câmara siliconada (nervo tibial esquerdo), os animais foram novamente anestesiados utilizando-se cetamina (40mg.kg⁻¹), midazolam (2mg.kg⁻¹) e meperidina⁸ (5mg.kg⁻¹) por via intramuscular. Neste momento foi realizada tricotomia ampla na região lateral de ambos os membros posteriores. O acesso venoso foi realizado através de punção da veia marginal da orelha e objetivou a administração fluidoterápica de 5mL/kg/h de solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%.

Na seqüência, instilou-se 0,2mL de lidocaína 1%⁹ na região da glote e através de hiperextensão atlanto-occipital para facilitar a abertura da epiglote e palpando-se a cartilagem laríngea, os animais foram intubados. Procedeu-se então a vaporização

⁸ Dolosal – Cristália, Itapira, SP, Brasil.

⁹ Lidol – Hipolabor, Sabará, MG, Brasil.

de isoflurano em oxigênio 100% a 1L/min para indução e manutenção do plano anestésico.

Preconizou-se a instituição de um período de jejum de apenas 2 a 3 horas de sólidos e líquidos, visando apenas impedir a repleção gástrica antes do procedimento anestésico-cirúrgico. Todos os animais receberam ampicilina sódica¹⁰, (10mg.kg⁻¹) por via subcutânea (SC) 30 minutos antes do procedimento como antibioticoprofilaxia. Efeito antiinflamatório e analgésico foi obtido a partir da administração de cetoprofeno¹¹ (4mg.kg⁻¹) também por via SC, 30 minutos antes do início da cirurgia de forma a se estabelecer um padrão de analgesia preemptiva e multimodal.

Com o animal posicionado em decúbito lateral, realizou-se anti-sepsia de pele com álcool-povidine-álcool e promoveu-se acesso cirúrgico pela face lateral da coxa (bilateralmente). Após incisão da fáscia lata e afastamento dos ventres dos músculos vasto lateral e bíceps femoral, localizou-se o nervo isquiático e suas ramificações e com auxílio de instrumental microcirúrgico dissecou-se-o de seu leito isolando a porção tibial. Através de secção aguda com tesoura de íris criou-se o defeito nervoso no terço médio de seu trajeto. Após, uma câmara siliconada¹² oca medindo 1,5mm e 2,42mm de diâmetro interno e externo, respectivamente, e 15mm de comprimento foi fixada com fio monofilamentar de náilon calibre 6-0¹³ em padrão isolado simples na camada epineural. O espaço criado entre as extremidades nervosas foi de 5mm de comprimento. No espaço entre os cotos nervosos do membro esquerdo, foi injetada (seringa de 1mL e agulha calibre 13x04) a fração de células tronco autólogas de medula óssea na concentração de 1.10^6 células em um volume de 0,1mL. (Figura 7).

¹⁰ Cilinon- Cristália, Itapira, SP, Brasil.

¹¹ Ketofen- Rhodia Mérieus, Paulínia, SP, Brasil.

¹² Medicone Projetos e Soluções para a Indústria e a Saúde Ltda. – Cachoeirinha, RS, Brasil.

¹³ Technofio - Ace Ind. e Com., Goiânia, GO, Brasil.

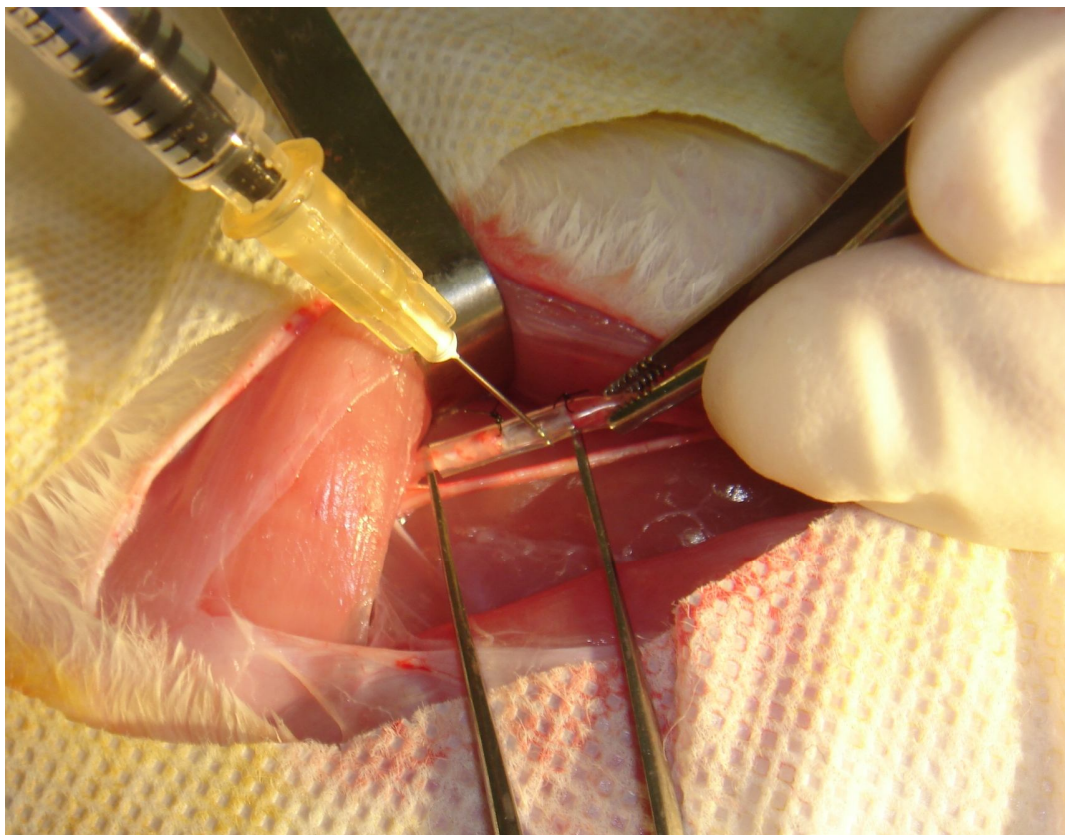


Figura 7– Fotografia demonstrando a prótese de silicone fixada às extremidades nervosas seccionadas e a injeção da fração de células tronco (1.10^6 células em 0,1mL) no interior da câmara.

Internamente a prótese fixada no membro direito, foi injetado o mesmo volume de solução de NaCl 0,9%. Durante todo procedimento utilizou-se uma lupa cirúrgica de cabeça¹⁴, objetivando a magnificação da imagem, promovendo desta forma, aumento de aproximadamente 4 vezes.

Como tratamento das feridas cirúrgicas, realizou-se limpeza com solução de NaCl 0,9% e aplicou-se tintura de benjoin ao redor da lesão. A aplicação de micropore objetivou a proteção mecânica contra sujidades, sendo que esta não foi trocada enquanto não se soltasse ou fosse retirada pelo próprio animal. Na grande maioria dos casos ela permaneceu durante os primeiros 3 ou 4 dias, período necessário para solução da incisão de pele. Desta forma, a limpeza diária e realização de curativo não foi necessária.

Os animais foram observados por um período de 30 dias, quando então foram submetidos à eutanásia para coleta, processamento e avaliação histológica da

¹⁴ Head Magnifying Glass, China.

amostra de nervo tibial (porção da prótese de silicone). As eutanásias foram realizadas aplicando-se cetamina (40mg.kg^{-1}) via intramuscular, seguida de sobredose de tiopental sódico via catéter na veia auricular marginal. As amostras obtidas foram separadas de forma aleatória e fixadas em dois tipos de soluções para posterior processamento; solução contendo glutaraldeído como base (Anexo 1) (12 nervos de 6 animais) e formol tamponado a 10% (12 nervos de 6 animais).

3.5 Processamento, análise das amostras e tratamento estatístico dos dados

Doze segmentos de nervos tibiais (direito e esquerdo) de seis animais (numerados 7, 8, 9, 10, 11, 12) foram coletados e fixados com a solução de glutaraldeído para serem processados através de cortes histológicos semifinos medindo $1\mu\text{m}$ de espessura. As amostras depois de fixadas foram incluídas em resina pura e clivadas em ultra-micrótomo. Posteriormente as lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,25% objetivando avaliação da regeneração das estruturas nervosas através de microscopia de luz. O Anexo 2 mostra as etapas de preparação dos cortes semifinos de forma mais detalhada.

Outras doze amostras de nervos tibiais (direito e esquerdo) de seis animais (numerados 1, 2, 3, 4, 5, 6) foram coletadas e fixadas em formol tamponado a 10%, incluídas em blocos de parafina e clivadas com $3\mu\text{m}$ de espessura. Posteriormente foram coradas pelo método de luxol fast blue e hematoxilina-eosina (HE) para posterior observação em microscópio de luz. As amostras coradas com HE e luxol fast blue foram avaliadas de acordo com algumas variáveis e observadas comparativamente. Esta análise histológica levou em consideração principalmente a presença de células inflamatórias (eosinófilos), de câmaras de digestão (degeneração Walleriana), presença de grânulos de hemossiderina e granulomas ou células gigantes nas diferentes porções nervosas, ou seja, no sítio de regeneração (local de fixação da prótese de silicone) e nas porções cranial e caudal a ele.

Para se atribuir pontuações a partir das variáveis observadas, as lâminas histológicas foram avaliadas de forma seriada, sempre pelo mesmo observador, de forma que este não identificasse o animal nem o segmento de nervo (direito ou esquerdo) a ser analisado. A metodologia de avaliação contemplou diferentes

formas de observação para as variáveis estudadas, e as possíveis alterações encontradas durante a avaliação estão listadas e pontuadas no Quadro 1.

Variáveis	Escore	
	Granuloma	Presença
Ausência		0
Eosinófilos	Número absoluto; contagem de eosinófilos pelo escaneamento da lâmina histológica.	
Hemossiderina	Número absoluto; contagem dos focos de hemossiderina pelo escaneamento da lâmina histológica.	
Degeneração Walleriana	Estimativa (%) do processo de degeneração Walleriana pela contagem de câmaras de digestão através do escaneamento da lâmina histológica.	

Quadro 1- Metodologia de avaliação das alterações encontradas nas lâminas histológicas coradas com HE e luxol fast blue.

Após a tabulação dos dados, realizou-se a análise estatística (SPSS versão 14.0 para Windows) aplicando-se o teste de McNemar para a variável granuloma e o teste de Wilcoxon para as variáveis eosinófilos, hemossiderina e degeneração Walleriana. O nível de significância considerado para o teste foi de 5% ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Discutindo sobre as observações e resultados obtidos com a experimentação, inicia-se justificando a escolha da espécie utilizada como modelo experimental. Desta forma, levaram-se em consideração alguns critérios de seleção como por exemplo a facilidade de manipulação e manutenção dos animais em biotério; o porte físico dos animais, diretamente relacionado ao tamanho das estruturas nervosas; a facilidade em estabelecer a anestesia e os cuidados pós-operatórios; os custos com a manutenção dos animais e a rapidez com que seriam obtidos os resultados, diretamente relacionada à velocidade do metabolismo do animal. Levando em consideração todas essas questões, decidiu-se pela utilização de coelhos Nova Zelândia albinos (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo experimental na pesquisa em questão.

Quanto aos procedimentos anestésicos em coelhos, Quinton (2005) afirmou que esta espécie apresenta-se normalmente refratária às anestésias fixas ou injetáveis. Para ele, a anestesia inalatória produz efeito rápido, seguro, proporcionando bom miorelaxamento e analgesia quando combinada com outras drogas. A aplicação desta técnica é especialmente necessária em procedimentos cirúrgicos longos ou dolorosos, e para tanto, o isoflurano é bastante seguro e constitui-se no anestésico mais indicado para manutenção do plano anestésico nesta espécie (QUESENBERRY, 1998; VILARDO, 2007). Este anestésico apresenta uma potência relativamente alta e seu baixo coeficiente de solubilidade sangue-gás permite uma indução e recuperação anestésicas rápidas (FANTONI, 2002). A aplicação da técnica de anestesia inalatória em coelhos é dificultada pelo procedimento de intubação, porém uma alternativa é o emprego de máscara facial para indução e manutenção anestésica (QUINTON, 2005). A administração de isoflurano em máscara demonstrou ser bastante conveniente e segura para o procedimento de coleta de medula óssea na pesquisa em questão. No entanto, para realização do procedimento cirúrgico, optou-se pela intubação dos animais, concordando com Hillyer (1994) que recomendou a sonda endotraqueal quando a cirurgia a ser desenvolvida necessite tempo superior a 20 minutos. A técnica de intubação, realizando hiperextensão atlanto-occipital para facilitar a abertura da epiglote e palpando-se a cartilagem laríngea como mencionado por Thurmon (1996),

foi aperfeiçoada pela anestesista responsável através dos vários procedimentos anestésico-cirúrgicos prévios (procedimentos piloto) realizados antes das cirurgias propriamente contabilizadas no presente estudo.

A cetamina foi incluída no protocolo escolhido devido ao seu efeito anestésico, anti-hiperalgésico e anti-alodínico comprovados em modelos de dor neuropática (RODRIGUEZ, 2003). Já o midazolam, foi utilizado com o intuito de proporcionar o relaxamento muscular necessário para os procedimentos efetuados, potencializando o efeito da cetamina e objetivando a rápida perda do reflexo laríngeo para posterior intubação (CALVO et al., 1997). O fentanil, foi escolhido por ser um opióide agonista no receptor μ , aconselhado para uso trans-operatório como analgésico pelo seu rápido início de ação, curta duração e alta potência (FLECKNELL & WATERMAN-PEARSON, 2000).

Ainda comparando as afirmações encontradas na literatura pertinente com o protocolo anestésico estabelecido, Tranquilli et al. (2005) afirmou que dor neuropática pode resultar de traumatismo, inflamação ou sensibilização de nervos periféricos ou medula espinhal. É definida como queimação, dor lancinante ou dor intermitente e costuma ser fracamente responsiva a um tratamento. Apesar do exposto pelo referido autor, procurou-se através da administração de diferentes fármacos minimizar a dor pós-operatória nos animais submetidos aos procedimentos.

O termo analgesia preemptiva se refere à aplicação de técnicas analgésicas antes do paciente ficar exposto a estímulos nocivos, como por exemplo, invasão cirúrgica. Isto reduz a intensidade e a duração da dor pós-procedimento e minimiza a probabilidade de um estado de dor crônica que estaria sendo estabelecido. Apesar da analgesia preemptiva não conseguir eliminar a dor pós-operatória, tem o objetivo de ajudar a evitar a sensibilização dos sistemas nervoso periférico e central durante o procedimento cirúrgico (TRANQUILLI et al., 2005). A aplicação de medicação anestésica baseada na administração de cetamina/fentanil para coleta de células tronco e cetamina/meperidina para realização do procedimento cirúrgico, adicionada do uso de medicação antiinflamatória e analgésica a partir do uso de cetoprofeno e citrato de fentanila, demonstrou ser uma técnica analgésica bastante eficaz.

Analgesia balanceada ou multimodal é obtida através da administração simultânea de duas ou mais classes de fármacos ou técnicas analgésicas. O fundamento da analgesia multimodal surge do objetivo de inibir a nocicepção em

diferentes pontos ao longo do trajeto da dor aferente por intermédio de mecanismos distintos (TRANQUILI et al., 2005). As combinações farmacológicas escolhidas para serem usadas no período peri-anestésico forneceu além de uma técnica de anestesia preemptiva, também uma forma de analgesia multimodal contribuindo para uma melhor recuperação do paciente, isenta de dor e bastante confortável. Através da ausência de sinais de dor referenciados por Hillyer (1994) e Jenkins (2004) para a espécie em questão como sendo: inatividade, anorexia, “ringir” de dentes e pobreza de resposta a estímulos, pôde-se observar que as medidas e técnicas utilizadas para evitar a instalação do processo doloroso foram eficazes.

A antibioticoprofilaxia baseada na administração de ampicilina sódica não demonstrou qualquer efeito colateral nos animais em questão, apesar de algumas referências não recomendarem o uso deste fármaco em coelhos. A ampicilina se torna prejudicial para coelhos, bem como a administração de alguns outros antibióticos, quando é aplicada por via oral, pois apresenta atividade contra a flora normal intestinal destes animais, deixando-os expostos a infecções intestinais fatais (GONZALO, 2007). Sulc et al. (1992) demonstraram a ausência de toxicidade e eficácia da aplicação de ampicilina em seus experimentos. Esses pesquisadores reduziram drasticamente os índices de meningite por *Haemophilus influenzae* em seus modelos experimentais com aplicações de ampicilina na dose de 50mg.kg⁻¹ via intravenosa.

As drogas e os métodos anestésicos utilizados tanto para coleta das células tronco, quanto para realização do procedimento cirúrgico foram baseados nas técnicas desenvolvidas nas Universidades da Califórnia (<http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/awRbtFrm.asp>) e de Cornell (<http://www.research.cornell.edu/care/CARE103.pdf>). Em suma, o protocolo escolhido demonstrou ser seguro e eficaz para utilização na espécie em questão, possibilitando pronta recuperação, livre de excitação ou qualquer outra intercorrência clínica.

A respeito do período de jejum a ser instituído nesta espécie, Quinton (2005) explicou que devido ao piloro do coelho ser muito estreito, este animal não apresenta capacidade de vomitar. Este autor recomendou um período de jejum máximo de 3 a 4 horas e concluiu que um intervalo maior que 4 ou 5 horas sem alimento e sem líquido torna-se prejudicial ao retorno do transito intestinal. O período

de jejum instituído, de concordância com Quinton (2005), colaborou para que o procedimento anestésico-cirúrgico não evidenciasse qualquer alteração significativa.

Em relação à técnica de reparo a ser empregada principalmente nos casos de perda extensa de tecido nervoso periférico, Costa et al. (2006) relataram alguns fatores relevantes que encorajam a escolha da técnica de tubulização em detrimento da aplicação de enxertos nervosos periféricos. Dentre estes fatores, destacam-se: a necessidade de produzir maior morbidade com a retirada de tecido autólogo de uma área doadora; a retirada extensa de tecido autólogo, que algumas vezes não se apresenta disponível; o maior tempo de execução da técnica de enxertia e a observação de resultados ainda insatisfatórios obtidos com o emprego de enxertos. Da-Silva et al. (2003) e Oliveira et al. (2004) relataram em numerosos estudos que avaliaram esta técnica, demonstraram uma significativa melhora do processo de cicatrização pela possibilidade de manipulação do microambiente das fibras nervosas a serem regeneradas. Dentre as substâncias testadas no interior da câmara, eles destacaram o uso dos adesivos de fibrina, gel de colágeno tipo I, gel de laminina, preparações contendo ácido hialurônico, fibronectina e mais recentemente as glicosaminoglicanas. Da mesma forma, citaram que os biopolímeros, as células gliais purificadas e os fatores neurotróficos também estão sendo testados.

Em concordância com estes autores e acreditando nas vantagens já consolidadas da aplicação da técnica de tubulização, objetivou-se promover o estudo dos possíveis efeitos benéficos da administração de substâncias exógenas internamente a prótese, neste caso em particular, as células tronco autólogas de medula óssea.

Durante a avaliação dos resultados do experimento, algumas observações não apresentaram diferenças entre os grupos controle e tratamento (membro posterior direito - MPD e membro posterior esquerdo - MPE, respectivamente), como por exemplo, déficit de apoio, presença de exudato no local da incisão cirúrgica e deiscência da sutura de pele. Observou-se neste trabalho, uma rápida cicatrização cutânea no local da incisão cirúrgica, sendo que com aproximadamente 4 ou 5 dias de evolução a ferida apresentava-se quase completamente solucionada e apenas alguns pontos precisaram ser retirados (os pontos de pele caíam ou eram retirados pelo próprio animal).

Durante a necropsia realizada para coletar o segmento do nervo tibial a ser analisado, nenhum animal demonstrou deiscência do local de fixação da câmara de silicone ao nervo. O exame macroscópico do sítio cirúrgico também não demonstrou diferença entre os grupos observados no que se refere à presença de tecido nervoso formado internamente à prótese, pois todos os nervos tibiais em ambos os membros apresentaram a “ponte” interligando as duas extremidades (Figura 8). Também nenhuma diferença significativa foi evidenciada entre os grupos com relação à aderência da prótese ao tecido muscular relacionado.

Estas observações vão ao encontro dos achados de Da-Silva et al. (2003), que utilizando como modelo experimental um espaçamento entre os cotos nervosos de 4mm em nervos ciáticos de ratos e 4 semanas de período pós-operatório, também observaram crescimento de “ponte” nervosa internamente à prótese em todos os animais dos grupos do experimento. Contrariamente, Chen et al. (2006) encontraram diferença entre os grupos estudados em seu trabalho. Com uma metodologia de 15mm de espaçamento criado entre os cotos nervosos de ratos e 10 semanas de recuperação pós-operatória, foi observada uma taxa de crescimento (ponte) nervoso de 50% (8/16) nos tubos do grupo controle e 81,2% (13/16) nos tubos do grupo tratado com células tronco mesenquimais de medula óssea.

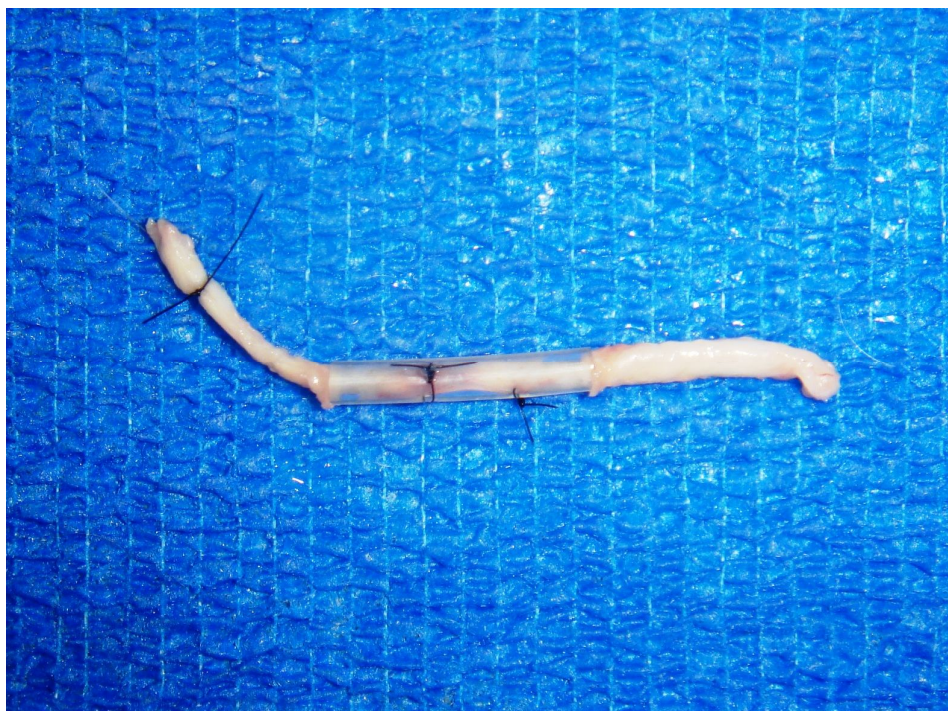


Figura 8– Fotografia demonstrando o crescimento nervoso dentro da prótese de silicone. O fio de sutura amarrado à extremidade serviu como marcação para porção proximal do nervo tibial.

Algumas variáveis como o teste dermatômico (que consiste no agulhamento das porções musculocutâneas inervadas pelo tibial, objetivando detectar níveis variáveis de hipoestesia) e a avaliação da marcha, não puderam ser diferenciadas nos dois grupos de estudo (MPD e MPE) pela dificuldade e subjetividade demonstradas nos procedimentos “piloto” com a espécie estudada.

Com relação ao procedimento de aspiração de medula óssea, Grindem et al. (2002), citaram como possíveis locais de se coletar amostras medulares, a crista ilíaca, o trocânter maior do fêmur e o tubérculo maior do úmero. Optou-se pela coleta a partir dos dois tubérculos umerais devido a dois motivos principais: extrair uma quantidade de aspirado de medula óssea suficiente para se manipular e separar a concentração total pré-estabelecida de 1.10^6 células e também para estabelecer uma padronização do traumatismo gerado pela coleta nos dois membros anteriores do animal. Procurou-se não realizar a coleta envolvendo os membros posteriores a fim de não mascarar qualquer sinal de claudicação (dor) neste local, interferindo com uma possível avaliação clínica.

Utilizaram-se três métodos de coloração dos cortes histológicos (HE, luxol fast blue e azul de toluidina) para avaliação das variáveis, com intuito de ratificar os resultados encontrados, excluindo as dúvidas inerentes a apenas um único tipo de avaliação. Além disso, como métodos distintos de análise histológica possibilitam avaliar diferentes variáveis, procurou-se observar aquelas que cada coloração apresentasse com mais clareza. A Tabela 2 demonstra as variáveis analisadas pela coloração com HE e a pontuação gerada para as alterações observadas nos cortes histológicos.

Tabela 2- Avaliação das diferentes variáveis (granuloma, eosinófilos e hemossiderina) observadas e seus respectivos valores referentes ao nervos direito (controle) e esquerdo (tratamento) nos cortes corados com HE.

Animais	Granuloma		Eosinófilos		Hemossiderina	
	Controle (D)	Tratamento (E)	Controle (D)	Tratamento (E)	Controle (D)	Tratamento (E)
1	1	0	9	3	22	135

2	1	1	161	1,5	0	15
3	1	1	174	25	1	43
4	1	1	26	73	121	75
5	0	1	17	28	57	63
6	1	1	2	3,5	16	10
Média	0,83	0,83	64,83	22,33	36,16	56,83
Desvio padrão	0,40	0,40	80,03	27,45	46,43	46,07

Nas lâminas coradas pelo HE foi observada a presença de granulomas compostos de macrófagos, células epitelióides e células gigantes associados à presença do fio de sutura. Este achado vai ao encontro do exposto por Thompson (1983), que incluiu como componentes presentes na reação granulomatosa, os macrófagos, as células epitelióides e as células gigantes, além de um componente cicatricial difuso formado de tecido conjuntivo. Não foi encontrada diferença entre os grupos a partir desta variável, segundo o teste estatístico de McNemar. Isto pode ser explicado devido o fato da reação granulomatosa estar diretamente ligada a presença de material estranho (fio de sutura) no tecido nervoso, o que ocorreu em ambos os grupos. Esta alteração indica a reação prolongada entre o hospedeiro e o material estranho, apresentando grande dificuldade de ser removido (THOMPSON, 1983).

Relacionando as outras alterações observadas nos cortes corados com HE, Karanth et al. (2006) relataram que a degeneração no segmento distal de um nervo transecionado vem acompanhada pela infiltração de monócitos, macrófagos, alguns poucos linfócitos e leucócitos polimorfonucleares. Complementa que a resposta imune facilita a remoção de debris mielínicos e axonais e incita a produção de citocinas e fatores neurotróficos, benéficos para o processo de regeneração axonal. Constituinte desta reação imunológica resultante, a infiltração por eosinófilos foi observada na grande maioria das secções histológicas (Figura 9), apresentando variação numérica entre os grupos controle (direito) e tratamento (esquerdo).

Eosinófilos reagem de forma específica a estímulos como reações antígeno-anticorpo, aparecendo em resposta à infecção por bactérias piogênicas e na

presença de tecido necrótico. São geralmente proeminentes na resposta à migração parasitária nos tecidos e nas reações alérgicas (THOMPSON, 1983).

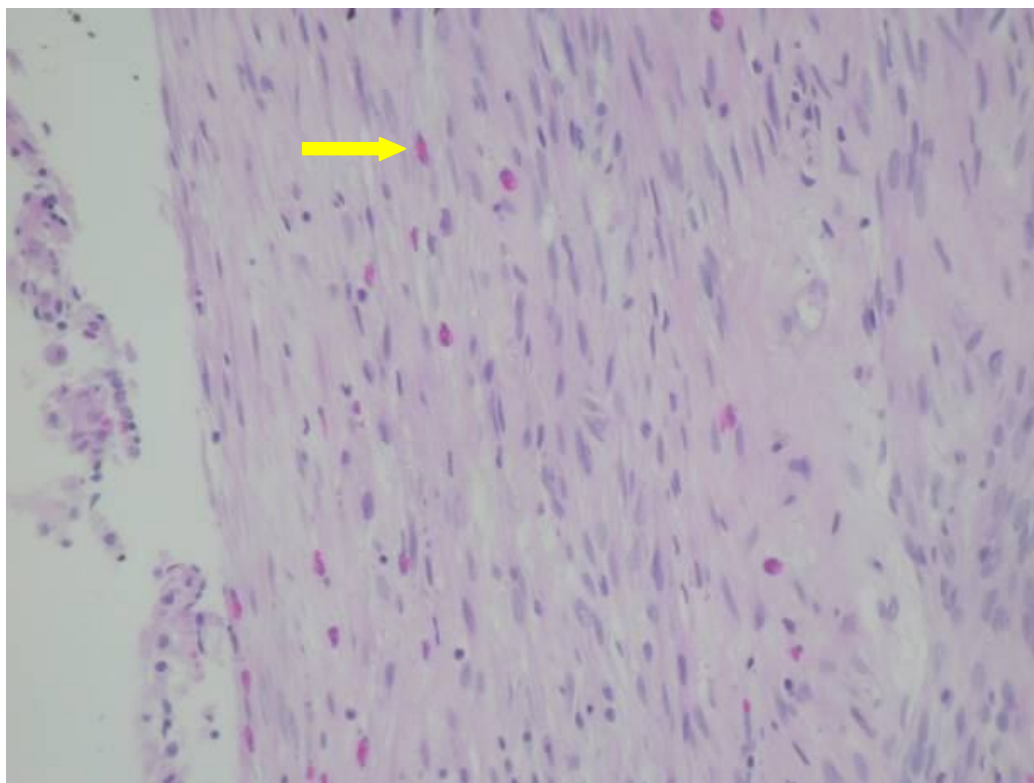


Figura 9- Fotografia demonstrando infiltração por eosinófilos (seta) no tecido nervoso regenerado da porção média do nervo tibial (corte longitudinal com coloração de HE e aumento de 400X).

Para este autor, se torna difícil fazer uma associação entre a presença de eosinófilos e a ocorrência de qualquer doença, a exceção das infecções parasitárias. Observando-se os resultados apresentados na Tabela 2, constatam-se valores inferiores no grupo tratamento para a variável eosinófilos. Contudo, tal diferença demonstrou não ser significativa, segundo o teste estatístico de Wilcoxon. De uma forma geral, infere-se que a presença em menor quantidade de células inflamatórias (como os eosinófilos) no grupo tratado com células tronco autólogas de medula óssea, esteja ligada a uma maior velocidade de resolução deste processo e, portanto, sua produção e permanência na lesão estariam em fase de declínio. O gráfico 1 (a e b), expressa de forma individual e generalizada os resultados da presença de eosinófilos obtidos a partir da análise das lâminas coradas com HE.

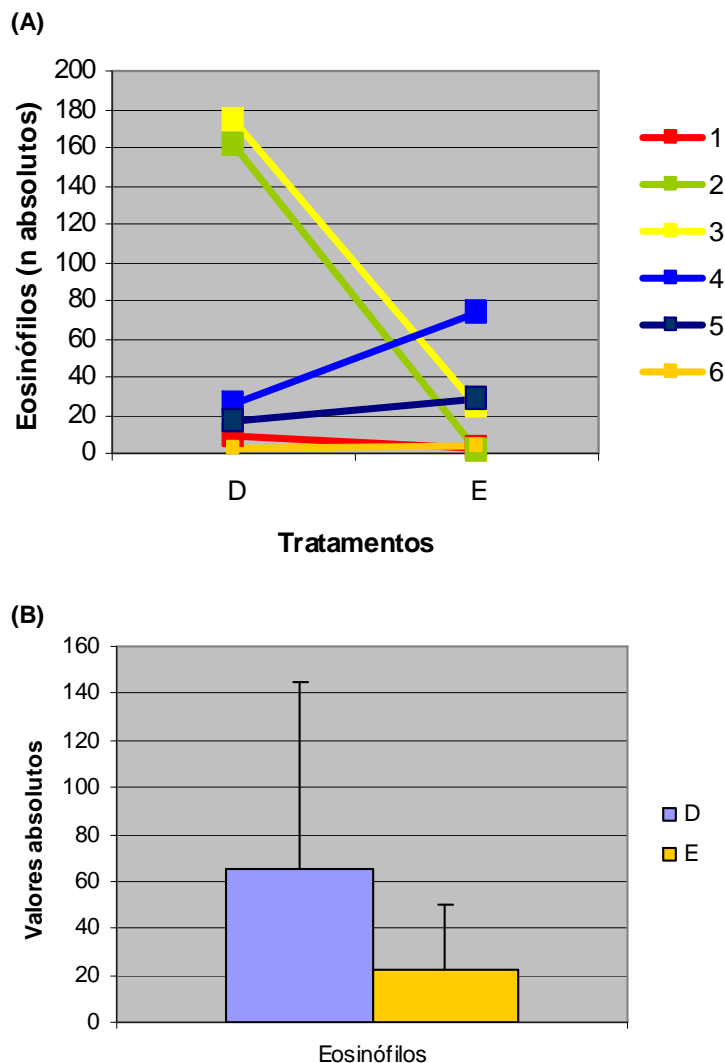


Gráfico 1- Representações gráficas dos valores individuais (A) e médios (B) para a variável eosinófilos nos grupos controle (D) e tratamento (E).

Em todas as lâminas observaram-se macrófagos carregados de hemossiderina em quantidades discretas. Os macrófagos são derivados dos monócitos no sangue, produzidos na medula óssea, possuindo a função principal de fagocitar, eliminar ou degradar parcialmente o material fagocitado. Processam muitos antígenos antes de entregá-los aos linfócitos para que estes realizem sua função específica. Quando os antígenos são degradados rapidamente, os

macrófagos desaparecem na mesma velocidade. No entanto, se muito antígeno se acumula em seu citoplasma, não sendo completamente degradado, estes residem por mais tempo na lesão. A presença destas células no tecido lesado pode ter duas principais interpretações: indicar uma lesão crônica ou ainda um estágio de limpeza após a cessação da batalha aguda (THOMPSON, 1983).

Ainda discutindo sobre as alterações microscópicas encontradas, conceitua-se hemossiderina como sendo um pigmento marrom contendo ferro e usualmente observado nos macrófagos do sistema retículo-endotelial. Este ferro encontra-se estocado na forma de ferritina (um complexo de proteína: apoferritina-ferro) em muitos locais do organismo como medula óssea e fígado. A ferritina está difusa na célula e não é visível, porém se o armazenamento é suficientemente concentrado nos lisossomos ela é conhecida como hemossiderina (agregados insolúveis de ferritina). É um achado bastante comum, aparecendo na forma de manchas amarronzadas nos tecidos corados por HE. A quantidade de hemossiderina pode portanto, dependendo das circunstâncias que deram início ao acúmulo, ser uma indicação das reservas de ferro corporal ou de degradação sanguínea. Assim, concentração acentuada de hemossiderina numa área de tecido, como neste caso, pode indicar hemorragia prévia (THOMPSON, 1983; GRINDEM et al., 2002).

No estudo em questão, observam-se focos de hemosiderina em concentrações variadas, observando-se uma maior taxa nas lâminas oriundas do grupo tratado com células tronco. No entanto, esta diferença não apresentou-se significativa segundo o teste estatístico de Wilcoxon. O gráfico 2 (a e b), expressa de forma individual e generalizada os resultados do aparecimento de focos de hemossiderina nas lâminas coradas com HE.

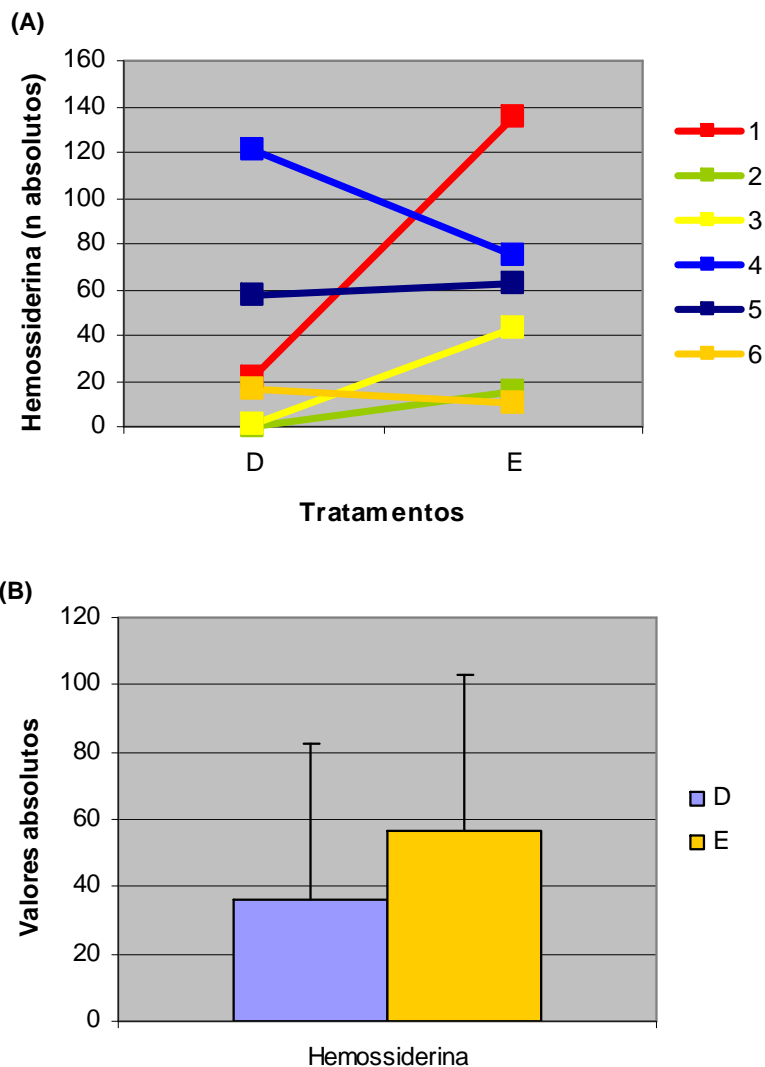


Gráfico 2- Representações gráficas dos valores individuais (A) e médios (B) para a variável hemossiderina nos grupos controle (D) e tratamento (E).

Outras observações notadas com a avaliação dos cortes histológicos foi a expansão do perineuro pela deposição de colágeno ou formação de edema, juntamente com a formação de numerosas câmaras de digestão (em focos ou ao longo do corte). A presença de câmaras de digestão indica a existência de degeneração Walleriana (DW) nos diferentes segmentos da fibra nervosa. A Tabela 3 demonstra os valores encontrados neste estudo com relação à presença de câmaras de digestão ou degeneração Walleriana, coradas pelo método de luxol fast

blue, uma vez que essas alterações são melhor visualizadas com este método de coloração.

Tabela 3- Valores em % da observação de degeneração Walleriana (DW) pela presença de câmaras de digestão nos cortes corados com luxol fast blue.

	1	2	3	4	5	6	Média	Desvio padrão
Controle (D)	15	30	30	20	20	20	22,5	6,1
Tratamento (E)	15	20	20	10	10	15	15	4,5

A degeneração Walleriana ocorre através da mediação do influxo de cálcio, via canais de íons específicos, que ativam as proteases axonais. Consequentemente, desintegração e degeneração do axolema e axoplasma ocorrem entre 24 e 48 horas, em nervos de pequeno e grande calibre respectivamente. Os macrófagos oriundos do sangue desenvolvem um papel essencial na fagocitose da mielina seguida de lesão nervosa, formando as câmaras de digestão. Essas células de defesa, são recrutadas para o coto distal da lesão em amplo número já no terceiro dia após a injúria. A infiltração no coto nervoso se dá como resposta a fatores de quimiotaxia que incluem citocinas como as interleucinas 1 β , fator de necrose tumoral (TNF- α) e proteína-1 quimiotática para monócitos, secretados pelas células de Schwann. Os macrófagos após penetrar principalmente na extremidade nervosa distal, permanecem aí por um período de no mínimo 30 dias, sendo responsáveis por remover a maioria dos debris mielínicos. Esses debris incluem a mielina associada à proteínas, como a mielina associada a glicoproteína (MAG), que conforme vem sendo demonstrada, parece apresentar atividade inibitória forte no crescimento axonal (FENRICH & GORDON, 2004). Concordando com as afirmações deste autor, observou-se através das lâminas histológicas que o processo de formação das câmaras de digestão, reconhecido por degeneração Walleriana (DW), encontrava-se ainda em desenvolvimento no período de trinta dias de observação pós-operatória (Figura 10).

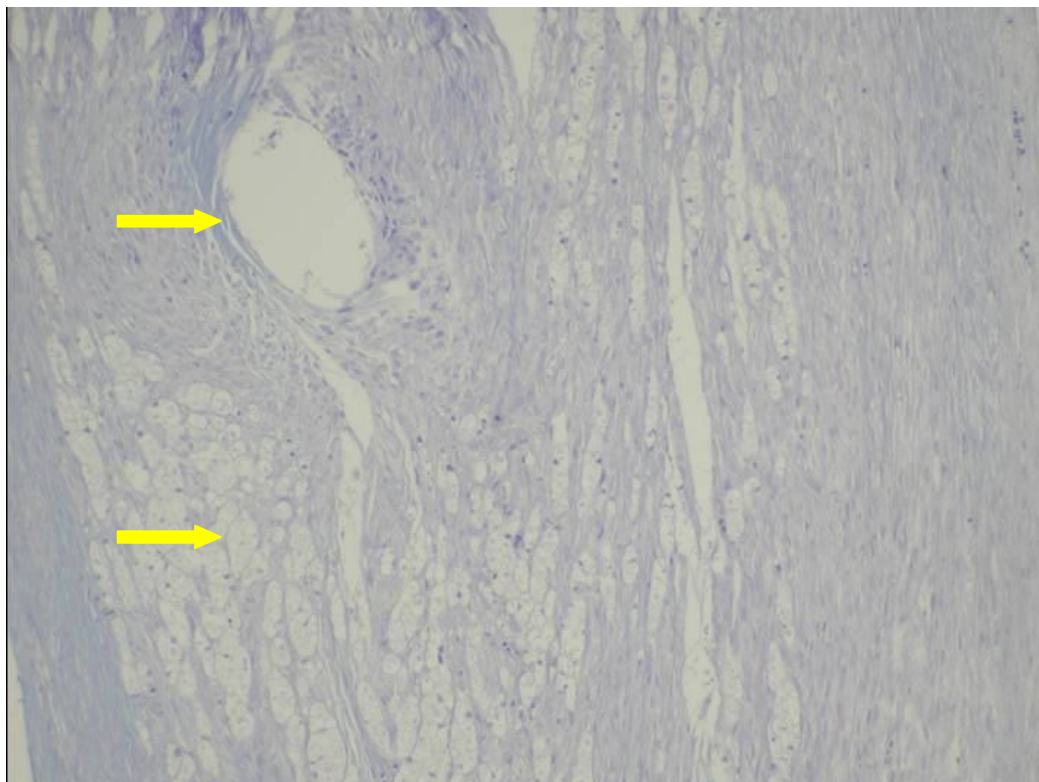


Figura 10- Fotografia demonstrando presença de degeneração Walleriana pela formação das câmaras de digestão (seta inferior) no tecido nervoso regenerado da porção média do nervo tibial. A seta superior demonstra o orifício deixado pelo material de sutura (corte longitudinal com coloração de luxol fast blue e aumento de 400X).

Com a avaliação dos valores expostos na Tabela 3, foi observado segundo o teste estatístico de Wilcoxon, diferença significativa entre os grupos estudados, demonstrando valores médios menores para DW nos animais tratados com as células tronco autólogas de medula óssea. O gráfico 3 (a e b), expressa de forma individual e generalizada os resultados da análise da variável DW, obtidos a partir da análise das lâminas coradas com luxol fast blue.

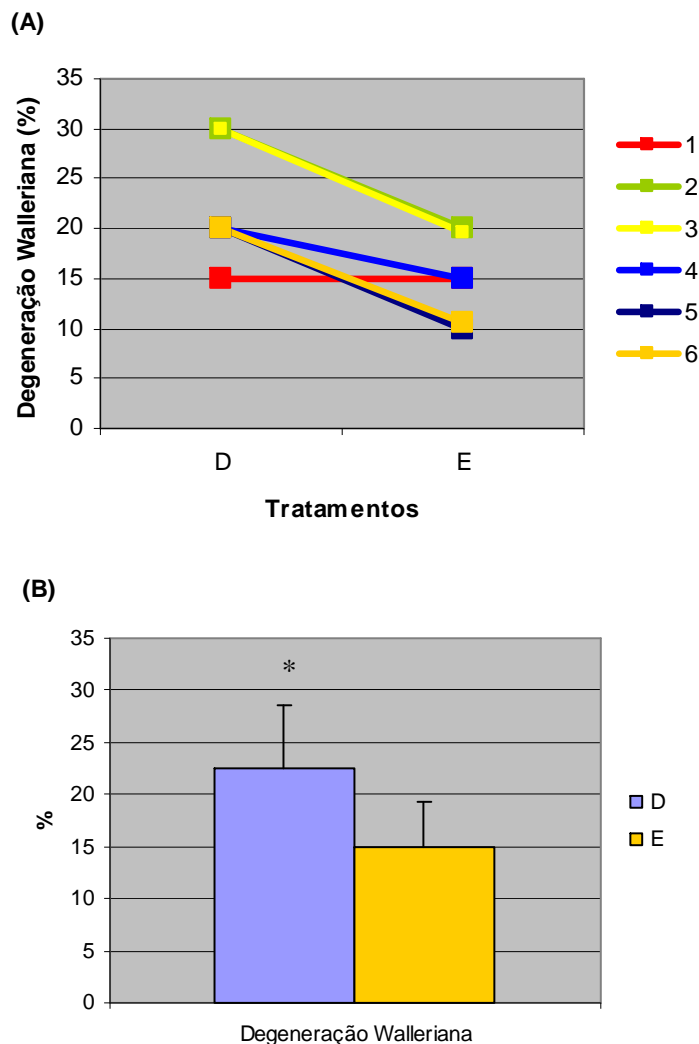


Gráfico 3- Representações gráficas dos valores individuais (A) e médios (B) para a variável degeneração Walleriana nos grupos controle (D) e tratamento (E). (* $p < 0.05$ Wilcoxon).

Com os cortes histológicos semifinos, corados pelo azul de toluidina, foi possível avaliar de forma qualitativa a regeneração nervosa, principalmente no que se refere a regeneração da bainha de mielina (Figura 11). Diversos estudos utilizaram este mesmo método de clivagem ($1\mu\text{m}$) e coloração para visualização das estruturas nervosas regeneradas (BLOCH et al., 2001; CUNHA et al., 2001; CHEM & CHEM, 2004). Esta metodologia possibilita a obtenção de lâminas histológicas com imagens mais definidas e nítidas quando comparada com outros métodos de

avaliação em microscopia óptica, permitindo uma avaliação mais minuciosa de estruturas como a bainha de mielina por exemplo. Foram identificadas fibras regeneradas ou remielinizadas com orientação longitudinal e mielina fina. Dando segmento a esta linha de pesquisa, outros trabalhos utilizando a mesma metodologia, poderão ser realizados posteriormente associando os resultados aqui obtidos com avaliação funcional do potencial de ação do nervo regenerado. Estes novos estudos poderão trazer contribuições importantes para uma determinação comparativa mais precisa do processo regenerativo através do emprego das células tronco autólogas de medula óssea.

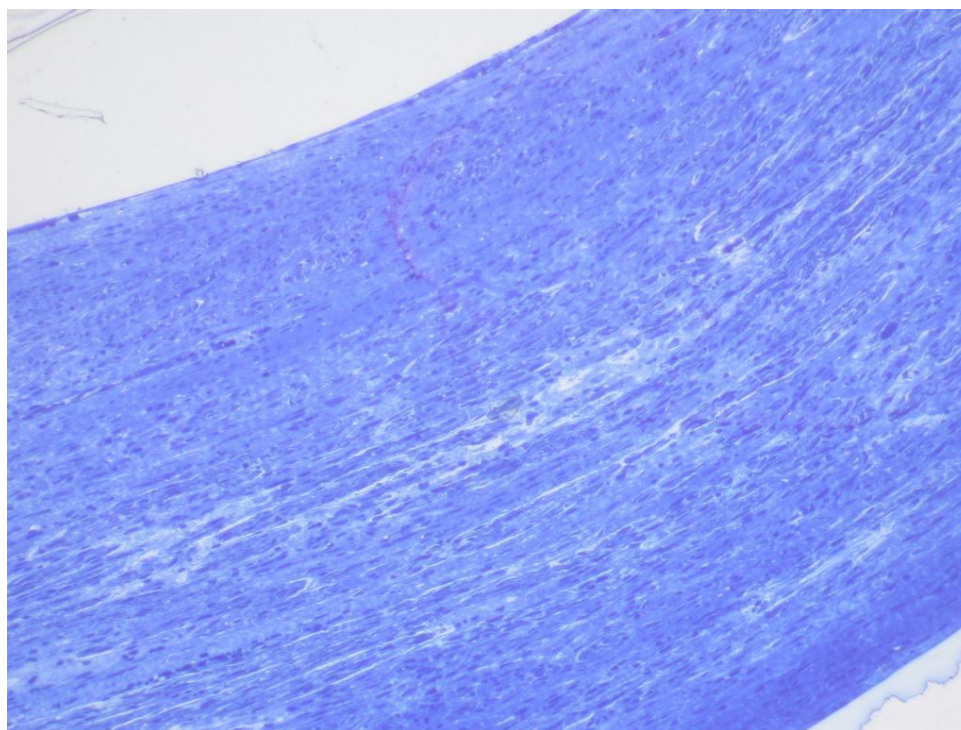


Figura 11- Fotografia demonstrando o padrão de regeneração das fibras nervosas na porção distal do nervo tibial direito (corte longitudinal ultra-fino com coloração de azul de toluidina 0,25% e aumento de 400X).

Chen et al. (2006) também observaram em seu estudo maturação e diâmetro axonal incompleto em comparação com nervos saudáveis. Avaliações experimentais com tempos adicionais, superiores e inferiores aos 30 dias de avaliação aqui

estudados, também colaborariam para melhor caracterizar o processo regenerativo com o uso de terapia celular autóloga de medula óssea.

Observou-se ainda, através da avaliação dos cortes semi-finos, número variável de neo-fascículos nas diferentes secções, independentemente de serem esquerdas ou direitas. Muitas vezes, as fibras apresentaram-se desviadas por vasos neoformados de parede fina e luz ampla. Estas mesmas observações são referidas no estudo de Costa et al. (2006) para os grupos de tratamento com tubo de ácido poliglicólico. Outro achado passível de ser descrito foi a identificação de células de Schwann supranumerárias. Com relação à quantidade de colágeno, apresentou ampla variabilidade entre os cortes. Através deste tipo de avaliação qualitativa, não foi possível observar de forma fidedigna se existe alguma diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. Por meio da avaliação morfométrica das fibras nervosas regeneradas, a ser realizada em uma etapa posterior, será possível mensurar de forma mais objetiva variáveis como: diâmetro das fibras mielínicas, diâmetro dos axônios mielínicos, espessuras das bainhas de mielina e diâmetro dos axônios amielínicos (STOPIGLIA et al., 1998; BLOCH et al., 2001; CHEM & CHEM, 2004, COSTA et al., 2006).

As pesquisas a cada dia confirmam os benefícios da administração exógena de substâncias como os fatores neurotróficos, células e citocinas no microambiente gerado através da tubulização nervosa (TERENGI, 1999; HEINE et al., 2004; CHEN et al., 2005; AQUINO et al., 2006). Até o presente momento, o foco da engenharia tecidual ligado à regeneração nervosa periférica tem sido direcionado primariamente para a implantação das células de Schwann isoladas, purificadas e expandidas *in vitro*, transplantadas internamente nas câmaras de tubulização. No entanto, devido à dificuldade de manipulação destas células, e à necessidade de uma determinada quantidade e vigor das culturas requeridas, o emprego deste tipo de terapia no reparo de nervos periféricos tem sido pequeno (HU et al., 2006). Cada vez mais, estudos vêm demonstrando o desenvolvimento de Células de Schwann a partir de células tronco mesenquimais *in vitro* com potencial de regeneração axonal *in vivo*. Baseado nesta capacidade plástica, este último autor mencionado citou que as células tronco mesenquimais podem ser usadas como substitutas para as células de Schwann em câmaras de tubulização para regeneração nervosa periférica.

O trabalho experimental demonstrado por Chen et al. (2006), mostrou o benefício do emprego dos aspirados de medula óssea no tecido nervoso lesionado. Este grupo demonstrou que células tronco derivadas de medula óssea, por apresentarem população heterogênea com distinta plasticidade, podem diferenciar-se numa variedade de tipos celulares, incluindo adipócitos, condrócitos, osteócitos, miócitos, hepatócitos, astrócitos e neurônios. Concordando com estes, o experimento em questão demonstrou através de seus resultados, vantagens no processo regenerativo do nervo tibial seccionado, tubulizado e transplantado com células tronco autólogas de medula óssea. Embora este estudo não venha elucidar qual o mecanismo de plasticidade das células transplantadas ou fatores de crescimento produzidos, conclui-se que através das condições microambientais fornecidas pela transferência das células mononucleares de medula óssea interiormente à câmara e o contato com as citocinas e fatores de crescimento expressos neste meio, a regeneração nervosa ocorre de forma mais rápida.

5 CONCLUSÃO

1. Mediante os resultados obtidos neste experimento é possível concluir que a técnica de tubulização em coelhos, em ambos os grupos de estudo, proporciona uma boa evolução do processo de regeneração nervosa em um período de 30 dias de observação pós-cirúrgica.

2. Pela análise das lâminas histológicas coradas pelo azul de toluidina, observa-se remielinização com presença de bainha de mielina fina em ambos os grupos de tratamento.

3. Existe diferença significativa entre a presença de degeneração Walleriana nos dois grupos de estudo, oportunizando concluir que o tratamento com células tronco autólogas de medula óssea apresenta vantagens no processo de regeneração do nervo periférico sob a técnica de tubulização.

4. Com as outras variáveis analisadas, apesar da diferença entre os grupos não ser estatisticamente significativa, é possível inferir que o processo regenerativo acontece de uma forma mais rápida no grupo tratado com as células tronco autólogas de medula óssea.

6 REFERÊNCIAS

ALLET, M.A. et al., Enxerto “versus” enxerto coberto com tubo de veia nas reparações nervosas. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 38, n.4, p. 193-200, 2003.

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

ALVAREZ-DOLADO, M. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature**, n. 425, p. 968-973, 2003.

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

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

BLOCH, J. et al. Nerve growth factor – and neurotrophin – 3 – releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. **Experimental Neurology**, v.172, p.425-432, 2001.

BRAUND, K.G. Distúrbios dos nervos periféricos. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 1, cap. 85, p. 989-1025.

BUTI, M. et al. Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation. **Experimental Neurology**, v.137, n.1, p. 26-33, 1996.

CALVO, L.J.E.; VALLÉS M.A.V., GARGALLO J.U. **Anestesia práctica de pequeños animales**. España: McGraw-Hill, 1997.

CHEM, E.M.; CHEM, R.C. Uso da cola de fibrina na anastomose nervosa: estudo comparativo experimental em ratos. **Revista AMRIGS**, v.48, n. 3 p. 171-174, 2004.

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

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

CHRISMAN, C.L. Neuropatias periféricas. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais**. São Paulo: Manole, 2. ed. 1996. cap. 154, p. 1333-1350.

CONTESINI, E.A. et al., Avaliação clínico-morfológica da regeneração nervosa periférica mediante alinhamento por tubo de silicone em caninos. **Ciência Rural**, v.22, n.1, p. 65-71, 1992.

CORNELL UNIVERSITY. Cornell University. Ithaca, NY, 2006. Disponível em: <<http://www.research.cornell.edu/care/CARE103.pdf>> acesso em: 25 set. 2006.

COSTA, M.P. et al. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n.1, p. 25-29, 2006.

COVAS, D.T. Células tronco mesenquimais. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a Nova Fronteira da Medicina**: São Paulo: Atheneu, 2006, p. 35-48.

CUNHA, M.T.R. et al. Partial epineural burying of nerve grafts with different sizes next to or distant from neurotomy's site: histological and electrophysiological studies in rat sciatic nerves. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, n.4, p. 187-194, 2001.

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

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

DEL CARLO, R.J. Células tronco: células da esperança. **Revista CFMV**, n.35, p. 60-68, 2005.

DELISTOIANOV, N.et al. Comparação de duas técnicas de neurografia do digital palmar em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.4-51, 2006.

DOURADO, E. et al., Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v.3, n.2, p. 49-54, 2003.

ELY, J.B. & CALTEUX, N. Envelope venoso, contribuição experimental à cirurgia dos nervos periféricos. **Revista AMRIGS**, v.27, n. 4 p. 454-461, 1983.

FANTONI, D.T. Anestesia no cardiopata. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. cap.30, p.294-320.

FENRICH K.; GORDON T. Axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems – current issues and advances. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 31, n. 2, p. 142-156, 2004.

FILIP, S. et al., Issues in stem cells plasticity. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.8, n.4, p. 572-577, 2004.

FLECKNELL, P.A.; WATERMANN – PEARSON, A. **Pain Management in Animals**. Inglaterra: Saunders, 2000.

FONSECA et al. Abordagem simplificada do nervo ciático por via posterior, no ponto médio do sulco glúteo-femoral, com o uso de neuroestimulador. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.52, n.6, p. 764-773, 2002.

FONTES, A.M.; ORELLANA, M.D.; PRATA, K.L. Células tronco e seus métodos de estudo. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a Nova Fronteira da Medicina**: São Paulo: Atheneu, 2006, p. 93-106.

GARIBALDI, L. Exame neurológico. In: PELLEGRINO, F.; SURANTI, A.; GARIBALDI, L. **Síndromes neurológicas em cães e gatos: avaliação clínica, diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Interbook, 2003. cap. 3, p.40-79.

GONZALO, A.C. Antibioticoterapia en Conejos y Pequeños Roedores. **Vet- Uy**. Disponível em: <http://www.vet-uy.com/articulos/artic_notrad/007/notrad007.html>. acesso em: 11 jan. 2007.

GRECCO, M.A.S. et al. Estudo da regeneração nervosa em nervos tibiais de ratos Wistar utilizando o Fluro-Gold® como marcador neuronal. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 225-229, 2003.

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

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

HIATT, J.L.; GARTNER, L.P. **Color Textbook of Histology**, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997. cap.9, p.115-185.

HILLYER, E.V. Pet rabbits. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** v.24, n.1, p. 25-65, 1994.

HU et al. Repair of extened peripheral nerve lesions in Rhesus Monkeys ussing acellular allogenic nerve grafts implanted with autologus mesenchymal stem cells. **Experimental neurology** (2006) prelo. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.11.018.

JENKINS, J.R. Soft tissue surgery. In: QUESENBERRY, K.E.; CARPENTER, J.W. **Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery**. 2nd ed. St. Louis: Saunders, 2004 , cap. 20, p. 221-230.

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

LABRADOR, R.O.; BUTI, M.; NAVARRO, X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. **Experimental Neurology**, n.149, p.243-252, 1998.

LAKSHMIPATHY U; VERFAILLIE C. Stem cell plasticity. **Blood Reviews**, n. 19, p. 29-38, 2005.

MARTINS, R.S. et al. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. **Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia**. v. 24, n. 1, p. 20-25, 2005.

MELLO, L. R. et al., Uso da ceulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 59, n. 2b, p. 372-379, 2001.

MIRSKY, R.; JESSEN, K.R. Embryonic and early postnatal development of Schwann cells. In: JESSEN, K.R.; RICHARDSON, W.D. **Glial Cell Development**. 2.ed. Oxford: New York, 2001. cap.1, p.1-20.

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

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina interna de pequenos animais. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2001.

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

PACHIONI, C.A.S et al. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: um estudo da vascularização. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 203-207, 2006.

PIERUCCI, A. Influencia do agregam sobre a migração das células de Schwann *in vitro* e regeneração nervosa periférica *in vivo* após transsecção do nervo ciático. 2004, dissertação. Mestrado em Biologia celular e estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

QUESENBERRY, K.E. Coelhos. In: BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. sec. 12, cap.9, p.1503-1522.

QUINTON, J.F. **Novos animais de estimação: pequenos mamíferos**. São Paulo: Roca, 2005.

RODKEY, W.G. Cirurgia dos nervos periféricos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1998, v.1, cap. 80, p. 1360-1368.

RODRIGUEZ, R. F. Estudo farmacológico de um novo modelo de dor neuropática: avulsão do tronco inferior do plexo braquial de rato. 2003, tese. Doutorado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ROWSHAN, K.; JONES, N.F.; GUPTA, R. Current surgical techniques of peripheral nerve repair. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v.14, p.163-170, 2004.

SANTOS, R.R. et al. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n.6, p. 490-495, 2004.

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

SHORES A. Lesão e reparo do nervo periférico. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Roca, 1996, cap. 6, p. 49-56.

SILVA, J B. et al. Efeitos das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. **Acta ortopédica brasileira**, v. 14, n. 5, 273-275, 2006.

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

SULC, P. et al. Experimental rabbit model of meningitis produced by *Haemophilus influenzae* serotype c. **The Journal of Medical Microbiology**, v.36, n.5, p. 312-317, 1992.

TERENGI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of anatomy**, n. 194, p.1-14, 1999.

THURMON, J.C. Anesthesia of Wild, Exotic and Laboratory Animals. In: _____. **Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia**. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Feabiger, 1996, cap. 21, p. 409-424.

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

TOOP, K.S.; BOYD, B.S. Structure and biomechanics of peripheral nerves: nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice. **Physical Therapy**, v.86, n.1, p.92-109, 2006.

TORRES, M.F.P.; GRAÇA, D.L.; FARIAS, E.L.P. Reparação microcirúrgicas de nervo periférico por meio de sutura, cola de fibrina ou bainha de Biofill® em ratos Wistar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.5, p. 557-561, 2003.

TRANQUILI, W.J. et al. **Tratamento da dor para o clínico de pequenos animais**. 2 ed, São Paulo: Roca, 2005.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA. UCSF – University of Califórnia. San Francisco, 2005. Disponível em: <<http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/awRbtFrm.asp>>. acesso em: 18 set. 2006.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a Nova Fronteira da Medicina**: São Paulo: Atheneu, 2006.

ZAGO, M.A. Células tronco: Terapia celular, transplante de células de tecidos ou de órgãos. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a Nova Fronteira da Medicina**: São Paulo: Atheneu, 2006a, p. 03-20.

_____. Células tronco: origens e propriedades. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a Nova Fronteira da Medicina**: São Paulo: Atheneu, 2006b, p. 109-113.

ZOCHODNE, D.W. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. **Muscle & Nerve**, n.23, p.33-38, 2000.

VILARDO, F.E.S. Lagomorpha (coelho, lebre lebre-assobiadora) In: CUBAS, Z.S. et al. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. sec. 5, cap. 27, p. 415-431.

VIOTT, A.M. Os nervos periféricos e suas alterações neoplásicas. 2006, dissertação. Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

7 ANEXOS

ANEXO 1 – Solução fixadora para a base de glutaraldeído objetivando a estabilização dos tecidos.

Glutaraldeído 25% + Paraformaldeído 2% + Tampão fosfato 0,12

(Solução final)

Glutaraldeído 2,5%.....	1mL
Paraformaldeído 8%.....	2,5mL
Tampão fosfato 0,2 M.....	5mL
H ₂ O.....	1,5mL
TOTAL.....	10mL

ANEXO 2 – Protocolo de preparação de amostras biológicas para realização de cortes ultra-finos.

- 1) Tratamento com a solução fixadora
- 2) Lavagens com tampão fosfato a 0,1M:
 - a. 3 banhos de 30 minutos cada
- 3) Pós-fixação com tetróxido de ósmio 2% com tampão 0,2M (1:1)
 - a. Tempo de duração de 30 a 45 minutos
- 4) Lavagens com tampão fosfato a 0,1M:
 - a. 3 banhos de 30 minutos cada
- 5) Desidratação
 - a. Acetona Pa. 30% - 10 minutos
 - b. Acetona Pa. 50% - 10 minutos
 - c. Acetona Pa. 70% - 10 minutos
 - d. Acetona Pa. 95% - 10 minutos
 - e. Acetona Pa. 95% - 20 minutos
 - f. Acetona Pa. 100% - 10 minutos
 - g. Acetona Pa. 100% - 20 minutos
- 6) Pré-embebição
 - a. São realizados banhos misturando o desidratante com a resina em proporções gradativas e crescentes. Cada banho deve durar no mínimo 2 horas.
- 7) Embebição
 - a. Realização de banhos de resina 100% durante 24 horas em rotater.
- 8) Inclusão
 - a. Aplicação em moldes de silicone, com resina pura e colocada em estufa com temperatura constante de 60° C durante 72 horas.