

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA  
NA REGENERAÇÃO DO NERVO TIBIAL EM COELHOS**

Camila França de Paula Orlando

Orientador: Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno

GOIÂNIA

2011



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     **Dissertação**     **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	Camila França de Paula Orlando		
E-mail:	camilafranca-vet@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:			Sigla:
País:	UF:	CNPJ:	
Título:	Células mononucleares autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial em coelhos		
Palavras-chave:	Nervo periférico; terapia celular; microscopia eletrônica.		
Título em outra língua:	Autologous mononuclear cells from bone marrow in the regeneration of tibial nerve in rabbits.		
Palavras-chave em outra língua:	Peripheral nerve, cell therapy, electron microscopy		
Área de concentração:	Patologia, clínica e cirurgia animal		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	28/02/2011		
Programa de Pós-Graduação:	Ciência Animal		
Orientador (a):	Adilson Donizeti Damasceno		
E-mail:	addamasceno@vet.ufg.br		
Co-orientador (a):*	Luiz Antônio Franco da Silva		
E-mail:	lafranco@vet.ufg.br		

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Camila França de P. Orlando

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 19 / 10 / 11

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

CAMILA FRANÇA DE PAULA ORLANDO

**CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA  
NA REGENERAÇÃO DO NERVO TIBIAL EM COELHOS**

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal junto à Escola de  
Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Federal de Goiás

**Área de concentração:**

Patologia, clínica e cirurgia animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno

**Comitê de orientação:**

Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva – EVZ/UFG

Prof. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda - ICB/UFG

GOIÂNIA

2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

O712c Orlando, Camila França de Paula.  
Células mononucleares autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial em coelhos [manuscrito] / Camila França de Paula Orlando. - 2011.  
82 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Nervo periférico. 2. Terapia celular. 3. Microscopia eletrônica. I. Título.

CDU: 619:636.92

**CAMILA FRANCA DE PAULA ORLANDO**

Dissertação defendida e aprovada em **28/02/2011**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



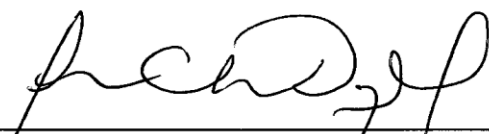
---

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno  
(ORIENTADOR (A))



---

Profa. Dra. Liliansa Borges de Menezes - IPTSP/UFG



---

Prof. Dr. Juan Carlos Duque Moreno

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu forças para continuar com esse projeto nos momentos mais difíceis em que achava que não ia conseguir.

Ao meu pai, onde quer que ele esteja, tenho certeza que deve estar orgulhoso de mim e me abençoando nessa trajetória. Saudades eternas!

A minha mãe Daise Regina, minha amiga de todos os momentos, responsável por mais essa etapa cumprida em minha vida. Obrigado por acreditar e confiar em mim, obrigado pela compreensão dos dias em que agente mal se via por conta do experimento, obrigada por me ajudar inúmeras vezes a cuidar de meus coelhos, enfim, obrigado pelo seu amor, também te amo.

Ao meu irmão Daylon de Paula, pela amizade, por compreender minha ausência em relação ao meu afilhado Gabriel, e pelo amor que ele sente e demonstra por mim.

Ao meu namorado Daniel Goulart, pela sua dedicação extrema ao projeto, pelo amor, carinho e amizade dedicado a mim, espero que Deus me dê a oportunidade de continuar com você pelo resto de minha vida.

Ao meu sogro e minha sogra, José Maria Goulart e Maria Aparecida, que me apoiaram durante toda a graduação e pós-graduação, sempre presentes e carinhosos, grandes responsáveis por eu estar aqui hoje.

Ao meu amigo Prof. Luiz Franco, eterno orientador e agora co-orientador, obrigado por todo o apoio que tenho recebido desde a graduação.

Ao meu orientador Prof. Adilson Donizeti Damasceno pela dedicação pelo comprometimento da minha orientação para a próxima etapa, pelos conselhos e carinho.

A minha co-orientadora Prof. Elisângela de Paula, pela disponibilidade de seu laboratório para que fosse processado parte do material de meu experimento.

Ao Prof. Marcelo Belleti, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), por ter disponibilizado seu laboratório de Microscopia eletrônica para realização das análises deste projeto. E ao técnico de laboratório da UFU, Marcelo pela dedicação nos momentos que precisei.

Ao meu amigo Leandro Franco pela anestesia de meus animais e pela orientação durante todo o meu projeto. Aos meus amigos sinceros que direta ou indiretamente me apoiaram durante toda a minha trajetória, Cássia Maria (por seus conselhos mesmo a distância), Késia Sousa, Caroline Rocha e Maria Ivete Moura.

A meus amigos Sarah, Ângela e Sandro que junto com os outros me proporcionaram momentos de alegria e descontração.

Ao professor Prof. Juan Carlos Duque Moreno pelos conselhos e por emprestar com gentileza seu analgesímetro digital e aceitar participar da banca.

A professora Liliana Borges de Menezes por aceitar o convite para participar de minha banca.

Ao Benito Juarez e o Luiz Augusto por ter realizado a colheita, isolamento e quantificação das células mononucleares.

Ao Danilo pela colaboração com a leitura das lâminas histológicas.

Aos estagiários Luiza, Marcos, Anderson e Tiago pela disponibilidade, colaboração e comprometimento com meu experimento.

Ao servidor técnico administrativo, Antônio Souza, por ter realizado os cortes histológicos.

A Vilda por estar sempre colaborando alegremente com as atividades do experimento.

Ao Paulo por cuidar do coelhário durante todo o período experimental.

A Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal, assim como seu corpo docente e pelos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo financiamento do estudo.

A empresa Guabi pelo fornecimento da alimentação para os animais durante o período experimental.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente e que por um equívoco não foram citados, mas que tiveram importância na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1.1 Considerações gerais .....	3
1.2 Organização estrutural do sistema nervoso .....	4
1.3 Neurônio.....	5
1.4 Anatomia do nervo periférico.....	6
1.5 Lesões de nervos periféricos.....	8
1.6 Regeneração de nervos periféricos.....	9
1.7 Técnicas de reparação de nervos periféricos.....	13
1.8 Terapia celular .....	17
1.9 Células-tronco .....	17
1.10 Células tronco da medula óssea.....	19
1.11 Células tronco na regeneração neural .....	20
1.12 OBJETIVOS.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2 – CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA NA REGENERAÇÃO DO NERVO TIBIAL DE COELHOS SUBMETIDOS À NEURECTOMIA: ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS.....	27
RESUMO.....	27
INTRODUÇÃO .....	28
MATERIAL E MÉTODOS .....	29
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO .....	39
CONCLUSÃO .....	42
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3 - CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA EM ASSOCIAÇÃO À TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO NA REGENERAÇÃO DO NERVO TIBIAL DE COELHOS: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA .....	45
RESUMO.....	45
INTRODUÇÃO .....	46

<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 – Desenho esquemático apresentando as camadas presentes na arquitetura de um nervo periférico: epineuro, perineuro e o endoneuro ..... 7
- FIGURA 2 - Esquema demonstrando a esquerda um nervo normal e a direita um nervo lesionado com o corpo celular em cromatólise. .... 11
- FIGURA 3 – Esquema demonstrando o processo de regeneração nervosa. Observa-se a fagocitose por células do sistema retículo endotelial (macrófagos), brotamento axônico e os cones de crescimento ..... 12
- FIGURA 4 – Desenho esquemático de uma neurografia epineural. .... 14
- FIGURA 5 - Esquema da técnica de tubulização. (A) Os cotos do nervo são suturados dentro de um tubo oco ficando um espaço entre eles. (B) formação de uma ponte entre os cotos, que inicialmente é formada por matriz de fibrina. .... 15

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 – Etapas do procedimento cirúrgico de lesão experimental e reparação pela técnica de tubulização, do nervo tibial em coelho A) tricotomia ampla no membro pélvico direito para o acesso cirúrgico demonstrado na linha pontilhada; B) incisão de pele e subcutâneo; C) incisão da fascia lata; D) isolamento da porção tibial do nervo ciático; E) introdução do coto nervoso no interior do tubo de silicone; F) aplicação das células mononucleares ou solução fisiológica no interior do tubo de silicone..... 34
- FIGURA 2 - Avaliação da locomoção e das pegadas de coelhos após indução de lesão do nervo tibial e reparação por meio da técnica de tubulização e tratados (Grupo Célula Mononuclear – GCM) ou não (Grupo Solução Salina – GSS) com células mononucleares de medula óssea. A) corredor onde foram capturadas as imagens de vídeo para posterior análise da marcha; B) teste de avaliação da área de impressão de apoio dos membros pélvicos; C) e D)

impressões das pegadas dos coelhos. Nota-se que a impressão da pegada do membro operado do GSS (seta da figura C) foi maior que no membro operado do GCM (seta da figura D) após sete dias do procedimento cirúrgico realizado no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG de julho-outubro de 2010..... 37

### **CAPÍTULO 3**

- FIGURA 1 - Aspecto macroscópico do nervo tibial de coelho após 60 dias da neurectomia cirúrgica. A) Nervo tibial no interior do tubo de silicone de um animal do GSS em que pode ser notado que não houve invasão de tecido adjacente para o interior do tubo. B) nervo tibial, após retirada do tubo, de um animal do GCM. Observa-se que a parte regenerada (seta amarela), apesar de mais estreita, possui o mesmo aspecto macroscópico que o nervo normal (seta laranja).52
- FIGURA 2 - Gráficos demonstrando os resultados da análise microscópica de amostras do nervo tibial de coelhos, corados com HE, tratados (GCM) ou não tratados (GSS) com células mononucleares autólogas de medula óssea, após lesão e correção cirúrgica por meio da técnica de tubulização realizada na Escola de Veterinária e Zootecnia/UFG, no período de julho a outubro de 2010. .... 53
- FIGURA 3 – Fotomicrografia eletrônica do nervo tibial de coelhos. A) Corte transversal do núcleo célula de Schwann demonstrando os poros na membrana nuclear (setas) e a cromatina descondensada e em grumos (estrela) em um animal do GSS (12000x). B) Núcleo da célula de Schwann demonstrando a cromatina em grumos e descondensada em um animal do GCM (12000x). C) Fenda encontrada na bainha de mielina (seta) de um axônio pertencente a um animal do GSS (12000x). D) Bainha de mielina com presença de baixa densidade demonstrado por um aspecto mais esbranquiçado (seta) (12000x). E) Orientação das fibras nervosas em corte longitudinal do GSS (400x); F) Fibras nervosas realinhadas do GCM (400x). .... 54

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 2

- QUADRO 1 - Equações matemáticas para a determinação do número de células, viabilidade celular e do fator de diluição para o processo de isolamento, contagem e viabilidade das células-tronco mononucleares. .... 32
- QUADRO 1 - Metodologia de avaliação das alterações encontradas nos cortes histológicos corados com HE do nervo tibial de coelhos tratados com células mononucleares autólogas de medula óssea (GCM) ou não tratados (GSS), após lesão e correção cirúrgica por meio da técnica de tubulização, realizada na Escola de Veterinária e Zootecnia/UFG, no período de julho a outubro de 2010. .... 51

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Escores da marcha de coelhos submetidos à lesão no nervo tibial com reparação por meio da técnica de tubulização tratados com células mononucleares de medula óssea (GCM) ou com solução de Cloreto de sódio a 0,9% (GSS), antes do procedimento cirúrgico (M0) e aos sete (M7), 15(M15), 30(M30), 45(M45) e 60(M60) dias após o procedimento cirúrgico realizado no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG de julho-outubro de 2010. .... 38

TABELA 2 - Valores, média e desvio padrão (DP) em cm<sup>2</sup> da área das impressões das pegadas de coelhos após lesão no nervo tibial submetidos a técnica de tubulização tratados (GCM) ou não (GSS) com células mononucleares autólogas de medula óssea em estudo realizado na Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG de julho-outubro de 2010 ..... 39

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Média em micrômetros e desvio padrão da área dos axônios mielínicos e espessura da bainha de mielina de nervos tratados (GCM) ou não tratados (GSS) com células mononucleares autólogas de medula óssea após neurectomia cirúrgica em coelho e correção por meio da técnica de tubulização em estudo realizado na Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG no período de julho a outubro de 2010. .... 55

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CMMO	Células mononucleares de medula óssea
COL	Colágeno
CT	Células-tronco
CTE	Células-tronco embrionárias
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTM	Células tronco mesenquimais
CTS	Células tronco somáticas
FN	Fibronectina
GCM	Grupo células mononucleares
GSS	Grupo solução salina
HE	Hematoxilina e eosina
HSPG	Proteoglicano de heparam sulfato
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LAM	Laminina
MEC	Matriz extra celular
MO	Medula óssea
N-CAM	Moléculas de adesão celular neural
FCN	Fator de crescimento neural
SC	Célula de Schwann
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico

## RESUMO

A restauração de nervos periféricos após lesões ou doenças congênitas vem sendo alvo de pesquisas sobre novas tecnologias que tragam bons resultados, chegando-se ao ponto de recuperar totalmente a atividade funcional de um nervo. Para isso, tem-se estudado o uso de materiais sintéticos associados com inoculação exógena de fatores que auxiliam no processo de regeneração, assim como células mononucleares de medula óssea. Com o desenvolvimento deste estudo objetivou-se avaliar a capacidade de regeneração nervosa periférica após defeito agudo do nervo tibial de coelhos da raça Nova Zelândia, corrigido mediante a técnica de tubulização, associada ou não à inoculação de células mononucleares autólogas de medula óssea no sítio da lesão. No primeiro capítulo realizou-se uma revisão de literatura ampla e detalhada acerca das lesões de nervos periféricos, os mecanismos de regeneração e as técnicas cirúrgicas empregadas na reparação de nervos periféricos. Além disso, relatou-se sobre a terapia celular bem como a utilização das células mononucleares na terapia de regeneração de nervos periféricos. No capítulo dois avaliou-se clinicamente se houve recuperação funcional nos coelhos após 60 dias da neurectomia cirúrgica. Foram utilizados para isto, 24 coelhos da raça Nova Zelândia, alocados em dois grupos com 12 animais cada, denominados grupo células mononucleares (GCM) e grupo solução salina (GSS). Os coelhos foram submetidos à secção do nervo tibial direito e reparação por meio da técnica de tubulização utilizando tubo oco de silicone, para então, receberem no interior do tubo células mononucleares autólogas de medula óssea no GCM e solução salina no GSS. Foram realizadas avaliações da marcha e planimetria da pegada do membro pélvico, antes (M0) e após o 7º (M7), 15º (M15), 30º (M30), 45º (M45) e 60º (M60) dias de procedimento cirúrgico. Os resultados mostraram que não houve a recuperação funcional do nervo em ambos os grupos, sem diferença entre eles nos diferentes momentos e entre os momentos dentro dos grupos, exceto quando comparado com M0. No capítulo três o objetivo foi utilizar análises histológicas e morfométricas para verificar se as células mononucleares autólogas de medula óssea associadas à técnica de tubulização auxiliam na regeneração do nervo tibial de coelhos. As células mononucleares foram retiradas da medula óssea por meio da punção no tubérculo umeral e purificadas para serem inoculadas como mencionado no capítulo dois. Após 60 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à eutanásia e as amostras do nervo foram colhidas e fixadas em formalina tamponada a 10% e solução de Karnovsky, para análise por microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão. Na microscopia óptica foram avaliadas a presença e intensidade de infiltrado inflamatório, grânulos de hemossiderina, granulomas, vasos sanguíneos, densidade celular e colágeno. Na microscopia eletrônica foram realizadas análises descritivas do núcleo das células de Schwann e a conformação da bainha de mielina. Além disso, foi realizada análise morfométrica dos elementos celulares empregando o programa *Image J*. Os resultados sugeriram que as células mononucleares não trouxeram benefícios na regeneração do tecido nervoso, porém, podem ter se diferenciado no tecido de sustentação trazendo benefícios para a regeneração nervosa.

**Palavras-chave:** Nervo periférico, terapia celular, histologia, morfometria.

## ABSTRACT

The regeneration of peripheral nerves after injury has been target in researches for new technologies that lead to good results, so as to get completely restoration of nerve function. For such, many techniques have been developed using synthetic materials associated to exogenous factors that enhance the regeneration process, as mononuclear cells of bone marrow. Thus, the development of this study aimed to evaluate the peripheral nerve regeneration capacity after surgical induction of an acute lesion on tibial nerve in New Zealand rabbits, with the association of tubulization technique to the inoculation of mononuclear cells collected from autologous bone marrow. First chapter showed a detailed literature review about nerve injuries, mechanisms of regeneration and main surgical techniques for nerve repair. Moreover, it described about cell therapy, especially mononuclear cells for peripheral nerve regeneration. Mononuclear cells were removed from the bone marrow through puncture of the humeral tubercle and were purified to be inoculated at the site of injury. In Chapter two, the rabbits were clinically evaluated, after 60 days, about the functional recovery after surgical neurectomy. For that, twenty four New Zealand rabbits were allocated in two groups with twelve animals each, designated mononuclear cell group (MCG) and saline solution group (SSG). In both groups, the rabbits were submitted to tibial nerve section and reparation through the tubulization technique, using silicone hollow tube. Later, mononuclear cells and saline solution were put within the tube in MCG and GSS, respectively. The gait evaluation was performed and also planimetry of the footprint of the pelvic member, which was printed on paper with water-based ink applied to the foot surface before (M0) and after 7 (M7), 15 (M15), 30 (M30), 45 (M45) and 60 (M60) days after the surgical procedure. The results showed that there was not functional recovery of the tibial nerve in both groups, without difference between them, at different times and at the moments between groups, except when they were compared with M0. In chapter three, the aim of the study was to verify histologically if the mononuclear cells of the bone marrow, associated with the tubulization technique, helped in regeneration of the tibial nerve of rabbits. After 60 days of surgery of surgery, the animals were euthanised and samples of the nerves were collected and fixed in 10% buffered formalin solution and Karnovsky solution, for the analysis by optical microscopy and electron microscopy. In optical microscopy the presence and intensity of inflammatory infiltration, hemosiderin granules, granulomas, blood vessels, cell density and collagen were evaluated. The electron microscopy performed descriptive analysis of the nucleus of Schwann cells and the conformation of myelin sheath. Furthermore, morphometric analysis of the cellular elements was performed using the program *Image J*. Results suggested that the mononuclear cells of the autologous bone marrow did not lead to benefits for the regeneration of the tibial nerve in rabbits.

**Keywords:** Peripheral nerve, cell therapy, histology, morphometry

## **CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 Considerações gerais**

O sistema nervoso periférico tem sido objeto de inúmeros estudos na tentativa de compreender os processos de reparação após uma injúria (GRECCO et al., 2003). Para que ocorra um processo de regeneração em nervos seccionados a neurorrafia epineural, descrita por Hueter em 1873, deve ser realizada como medida inicial de tratamento da lesão na maior parte dos casos (GRECCO et al., 2003). Entretanto, apesar da regeneração tecidual, o retorno das características funcionais do nervo lesado raramente é alcançado (EVANS, 2000)

Na tentativa de minimizar os riscos de complicações por neurorrafias e promover melhor alinhamento das fibras nervosas durante o processo de reparação tecidual, várias técnicas cirúrgicas e métodos de avaliação vêm sendo descritos na literatura (DAZA et al., 1999; COSTA et al., 2006; GUO & DONG, 2009). A técnica de tubulização é consideravelmente estudada na atualidade por apresentar resultados positivos no processo de reparação de defeitos em nervos periféricos em vários modelos experimentais (CORTES et al., 2003; WANG et al., 2006; COLOMÉ et al., 2008).

Além da realização de técnicas cirúrgicas visando o melhor restabelecimento do tecido nervoso após a lesão, várias estratégias têm sido empregadas como tratamento auxiliar nessas situações. De acordo com SANTOS et al. (1999), fatores extrínsecos vêm sendo avaliados na potencialização do crescimento axonal, tais como: fator de crescimento nervoso (FCN), colágeno, laminina, fibronectina em gel (CHEN et al., 2000), antibióticos (COSTA et al., 2006) e mais recentemente, as células-tronco (GUO & DONG, 2009; XU et al., 2010).

A terapia celular utilizando células provenientes da medula óssea é foco de inúmeros estudos. Isto se deve ao fato de que na medula óssea existe uma população rara de células-tronco multipotenciais capazes de suportar a hematopoese e se diferenciar em diversas linhagens celulares denominadas de células tronco mesenquimais (CTM) (COVAS, 2006; NARDI & ALFONSO, 2006).

Assim, a utilização de células mononucleares de medula óssea em associação às técnicas de tubulização é descrita por influenciarem no processo de regeneração de nervo periférico (COLOMÉ et al., 2008).

Diante da necessidade de estudos relacionados à reparação tecidual no sistema nervoso e da representatividade do tema dentro das discussões científicas na atualidade, acredita-se que seja um assunto relevante. Almeja-se que com esse estudo seja possível promover a regeneração tecidual e funcional ao nervo tibial de modelos experimentais submetidos à secção e reparação cirúrgica através da técnica de tubulização juntamente com a adição de células mononucleares autólogas de medula óssea.

## **1.2 Organização estrutural do sistema nervoso**

De forma geral, o sistema nervoso pode ser dividido em dois sistemas fundamentais: sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é constituído basicamente pelo encéfalo e medula espinhal com função de receber, interpretar e conduzir informações para órgãos efetores via SNP (SCHMIDT & LEACH, 2003). Uma série de ossos protetores envolve todo o SNC. O encéfalo é envolto pelo crânio e a medula espinhal é rodeada por uma série de vértebras e ligamentos, cervicais, torácicos e lombares. Essas vértebras estão alinhadas de modo a formar um conduto ou canal funcional, através do qual passa a medula espinhal (CUNNINGHAM, 2004).

A medula espinhal é composta por dendritos, axônios e corpos celulares. O centro da medula espinhal, uma região em formato de borboleta referida como substância cinzenta, contém corpos celulares de neurônios, células da glia e vasos sanguíneos. A substância cinzenta está envolvida pela substância branca, que ajuda na proteção, isolamento da medula espinhal e condução de estímulos. Na substância branca encontram-se axônios e células da glia, incluindo oligodendrócitos, astrócitos e micróglia. Os oligodendrócitos promovem a mielinização dos axônios do SNC, ao passo que os astrócitos contribuem para a formação da barreira hematoencefálica, que separa o SNC do sangue. Os axônios projetam feixes para a substância branca, conhecidos como fascículos,

que saem da cobertura óssea da medula espinhal, passam pela zona de transição do SNC-SNP e entram no SNP. A zona de transição está claramente definida como a região onde as células da glia do SNC são separadas do SNP (CUNNINGHAM, 2004).

O SNP é dividido em subsistemas motor (eferente) e sensorial (afferente). Dentre os nervos periféricos motores estão os neurônios motores somáticos, os quais conduzem as ordens, sob a forma de potenciais de ação, do SNC para as junções sinápticas nos músculos esqueléticos e os neurônios motores do sistema nervoso autônomo, os quais conduzem potenciais de ação, por meio de uma sinapse intermediária, para sinapses com o músculo liso, músculo cardíaco e algumas glândulas exócrinas (CUNNINGHAM, 2004).

Dentro do canal espinhal, os nervos periféricos sensoriais e motores são separados. Os nervos sensoriais entram para a medula espinhal através das raízes nervosas dorsais, enquanto os nervos motores saem da medula espinhal pelas raízes nervosas ventrais. Todas as estruturas exclusivas do SNP têm origem a partir da crista neural. Nos gânglios periféricos existem neurônios, células de Schwann e células satélites (CUNNINGHAM, 2004; COLOMÉ, 2007).

### **1.3 Neurônio**

O sistema nervoso é composto por dois tipos de células: neurônio e neurógli. Os neurônios compõem a estrutura básica e o elemento funcional do sistema nervoso. São células especializadas em receber, processar e transmitir informações (KANDEL, 2000). Como toda célula, o neurônio possui uma membrana plasmática que envolve um citoplasma contendo organelas que desempenham diferentes funções: o núcleo, repositório do material genético que determina forma e função do neurônio; as mitocôndrias, usinas de energia para o funcionamento celular; o retículo endoplasmático, sistema de cisternas onde ocorre a síntese e o armazenamento de substâncias que participam do metabolismo celular (LENT, 2005).

Morfologicamente, o neurônio consiste no corpo celular (soma) e grande número de prolongamentos, ramificados múltiplas vezes como pequenos

arbustos. Os dendritos, palavra de origem grega que significa “pequenos ramos de árvore” recebem as informações provenientes de impulsos emitidos por outros neurônios. Observando os prolongamentos que emergem do soma, percebe-se que um deles é mais longo e mais fino, ramificando-se pouco no trajeto e muito na sua porção terminal. É denominado axônio ou fibra nervosa. É pelo axônio que saem os impulsos elétricos dirigidos as outras células como células musculares ou outro neurônio. A região de contato entre um axônio e outro neurônio é a sinapse (SCHMIDT & LEACH, 2003; LENT, 2005).

Os axônios de neurônios se associam em feixes no SNC e em nervos no SNP com a função de conduzir sinais com a maior velocidade possível. Por isso, muitas fibras nervosas se associam a certas células gliais que estabelecem em torno da fibra uma espessa camada isolante chamada bainha de mielina, que possibilita a condução muito rápida dos sinais elétricos produzidos pelos neurônios (LENT, 2005).

#### **1.4 Anatomia do nervo periférico**

O nervo periférico é formado por axônios motores e sensoriais e é circundado pelo tecido de suporte que, anatomicamente, forma um tronco nervoso. Microscopicamente, nas secções dos nervos periféricos, é possível observar a arquitetura intrincada desse tecido. Os axônios e células de Schwann estão localizados em compartimentos endoneurais, que são rodeados pelo perineuro. Este por sua vez, forma fascículos individuais que são envoltos por tecido fibroso epineural (Figura 1) (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

##### **1.4.1 Epineuro**

O epineuro consiste de uma pequena quantidade de tecido conjuntivo que tem a função de manter os fascículos neurais reunidos e atuar como uma barreira semipermeável. Funde-se com o tecido adiposo que margeia os nervos periféricos, particularmente no tecido subcutâneo (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). Além de fibroblastos, o epineuro também apresenta mastócitos, colágeno e

fibras elásticas. A quantidade de tecido epineural é variável, sendo mais abundante próximo às articulações (HAM & CORMACK, 1979). O epineuro possui vasos sanguíneos que irrigam os nervos maiores. Os ramos desses vasos penetram no perineuro, carregando inicialmente consigo uma bainha perineural, que depois têm o mesmo percurso no nervo (RIET-CORREA, 2001).

#### 1.4.2 Perineuro

O perineuro é formado por camadas concêntricas de células delgadas que são separadas por lâminas de colágeno. O número de camadas celulares varia de nervo para nervo e depende do tamanho do fascículo nervoso (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). As células perineurais eventualmente fundem-se com os axônios dos nervos sensitivos na sua porção terminal (HAM & CORMACK, 1979).

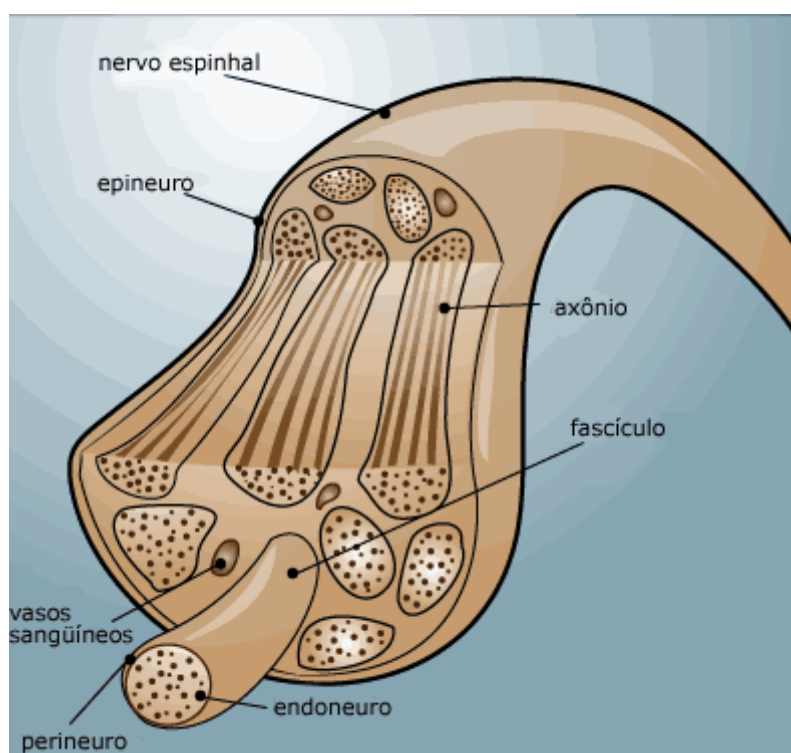


FIGURA 1 – Desenho esquemático apresentando as camadas presentes na arquitetura de um nervo periférico: epineuro, perineuro e o endoneuro. <http://saude.hsw.uol.com.br/nervo2.htm>

A superfície interna é revestida por várias camadas de células epiteliais unidas por junções oclusivas e envolta por uma membrana basal que isola o ambiente neural. Essas células são contráteis e apresentam uma quantidade apreciável de microfilamentos característicos das células musculares lisas. Além disso, nos casos em que há duas ou mais camadas celulares ocorrem à presença de fibras de colágeno entre as camadas, mas os fibroblastos típicos estão ausentes (RIET-CORREA, 2001).

#### 1.4.3 Endoneuro

No endoneuro se localizam os axônios envoltos pelas células de Schwann além de fibras colágenas, fibroblastos, capilares e alguns mastócitos (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). O espaço endoneural é interno ao perineural e contém uma matriz extracelular constituída de glicoproteínas produzidas pelas células endoneurais, pelos fibroblastos ou pelas células de Schwann. Essa matriz lubrifica as fibras nervosas para que se deslizem durante o movimento do corpo. Essa matriz ainda é responsável pela manutenção do ambiente iônico das fibras nervosas favorável à condução do impulso nervoso (RIET-CORREA, 2001).

### 1.5 Lesões de nervos periféricos

As lesões de nervos periféricos podem ser classificadas em neurotmeze, axonotmeze e neuropraxia. Ocorre neurotmeze caso seja rompido o nervo periférico inteiro com todos os seus feixes de fibras, resultando em um intervalo entre as extremidades nervosas rompidas. Ocorre axonotmeze caso sejam rompidos somente alguns axônios no nervo, mas a continuidade anatômica é mantida. A neuropraxia é uma disfunção fisiológica transitória aguda de um nervo periférico após uma lesão traumática (BURNETT & ZAGER, 2004).

As lesões de nervos periféricos são relativamente comuns e resultam geralmente de acidente automobilístico, fraturas, lesões penetrantes (por exemplo, ferimentos por projétil, ferimentos perfuro-cortantes, lacerações,

ferimentos por mordedura) ou causas iatrogênicas (por exemplo, injeção intramuscular de um agente irritante próximo a um nervo, colocação cirúrgica de uma sutura aprisionando um nervo, colocação de um pino intramedular próximo a um nervo, traumatismo nervoso durante a exposição cirúrgica de uma fratura de osso longo) (FOSSUM, 2005).

## **1.6 Regeneração de nervos periféricos**

As pesquisas sobre regeneração do sistema nervoso periférico tiveram início com as descrições feitas por RAMÓN & CAJAL, em 1905, e foram retomadas na I e II Guerras Mundiais (TORRES et al., 2003). Para que ocorra uma resposta regenerativa bem sucedida e a consequente recuperação da função, após as lesões nos neurônios, uma sequência de respostas celulares deve estar associada (MAKWANA & RAIVICH, 2005).

Os eventos que ocorrem no processo regenerativo de nervos periféricos incluem fagocitose dos axônios em degeneração pelos macrófagos, proliferação das células de Schwann (SC) e síntese de fatores de crescimento no coto distal. Concomitantemente, uma ponte constituída de fibrina conecta os cotos, sendo povoados por células não-neurais, vasos sanguíneos e componentes na Matriz Extracelular (MEC). Em sequência, ocorre o brotamento axonal do coto proximal em direção ao coto distal, sendo acompanhado pela mielinização dos axônios pelas SC (LEBEAU et al., 1988).

### **1.6.1 Modificações no segmento distal do nervo**

Com a transecção completa do nervo periférico, há perda da continuidade e retração, de forma que este passa a apresentar um coto proximal (segmento proximal) e um coto distal (segmento distal), podendo ocorrer vazamento do material axoplasmático em virtude do rompimento da membrana celular dos axônios (TERENGI, 1999).

No coto distal ocorre uma série de mudanças, inicialmente descritas por WALLER (1850), sendo denominada em conjunto, como degeneração

Walleriana. Devido à interrupção do contato com o corpo celular, a ausência de suporte trófico e ao aumento da entrada de íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) nas fibras, inicia-se a degeneração do coto distal com a fragmentação da bainha de mielina e dos axônios (LUNN et al., 1989; BURNETT & ZAGER, 2004). Concomitantemente, ocorre um recrutamento dos macrófagos em direção ao local da lesão, bem como a proliferação e multiplicação das SC. As SC liberam citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8, envolvidas no recrutamento dos leucócitos que atuam na fagocitose da mielina fragmentada e dos restos de axônios em degeneração (RUTKOWISK et al., 1999). Os macrófagos, por sua vez, secretam fatores de crescimento e citocinas, IL-1, IL-6, IL-12, os quais agem como fatores quimiotáticos para as SC aos neurônios lesados (STOLL et al., 1989; KIEFER et al., 2001).

#### 1.6.2 Modificações no segmento proximal do nervo

Na região proximal à lesão os axônios sofrem um processo de degeneração semelhante ao que ocorre no coto distal, mas geralmente estendendo-se apenas ao nódulo de Ranvier mais proximal (TERENGHI, 1999). Em sequência à degeneração, ocorre o brotamento axonal do coto proximal em direção ao coto distal, sendo acompanhado pela mielinização dos axônios pelas SC (LE BEAU et al., 1988). Para que ocorra esse brotamento axonal, deve haver a produção de moléculas de adesão celular como a laminina (LAM) e fibronectina (FN), Estas também fazem parte das moléculas presentes na MEC, tais como colágeno (COL) e proteoglicano de heparan sulfato (HSPG), fundamentais para que os brotamentos axonais do coto proximal alcancem o coto distal (MARTINI et al., 1994; CHEN et al., 2007; JIANG et al., 2009).

O corpo celular, logo nas primeiras horas após a lesão, 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) (Figura 2). 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 (ZIGMOND, 2001). Essas proteínas, representadas

principalmente pela actina e pela tubulina, estão relacionadas ao transporte intracelular e a movimentação do cone de crescimento (TASHIRO & KOMIYA, 1991; MARTINS et al., 2005).

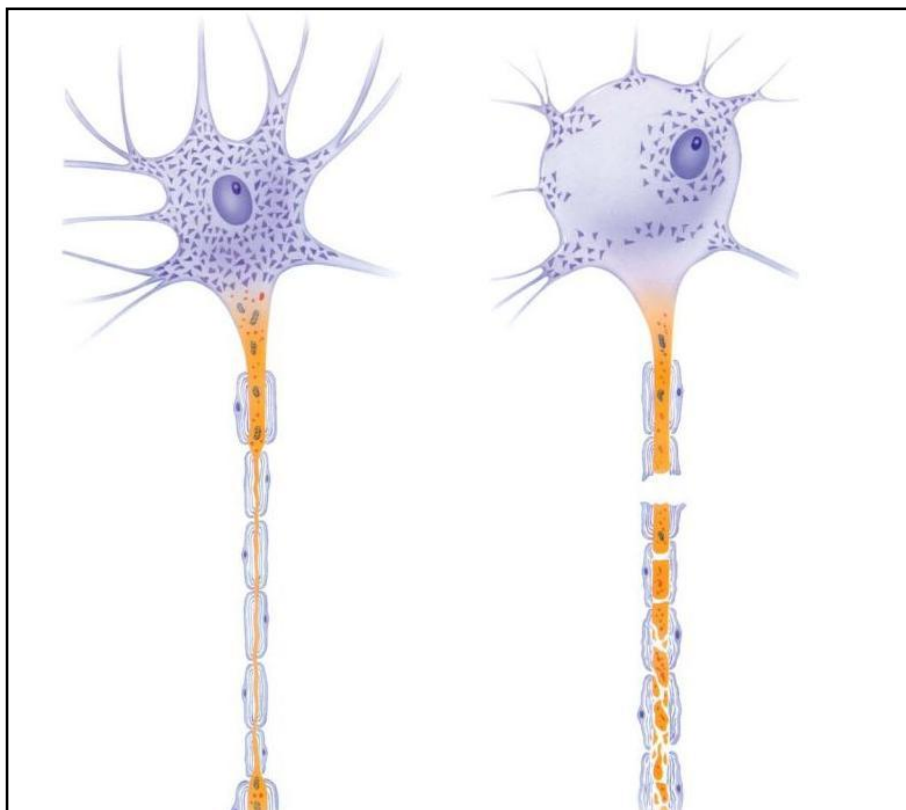


FIGURA 2 - Esquema demonstrando a esquerda um nervo normal e a direita um nervo lesionado com o corpo celular em cromatólise. Fonte: MATTAR JUNIOR & AZZE, 2010

O intervalo entre os dois cotos do nervo, quando há uma transecção, é preenchido com sangue e é formado um coágulo de fibrina (OLIVEIRA et al., 2004). A este coágulo convergem capilares e fibroblastos de tecidos adjacentes e dos cotos do nervo. Na extremidade do coto proximal, os axônios formam protrusões axoplasmáticas denominadas de broto de crescimento (LANDIS, 1983) (Figura 3). Logo após a formação dos brotos axonais, há um aumento da presença de mitocôndrias e vesículas e essas estruturas passam a ser

denominadas de cones de crescimento, sendo consideradas como a extremidade de um axônio bem desenvolvido (MARTINS et al., 2005).

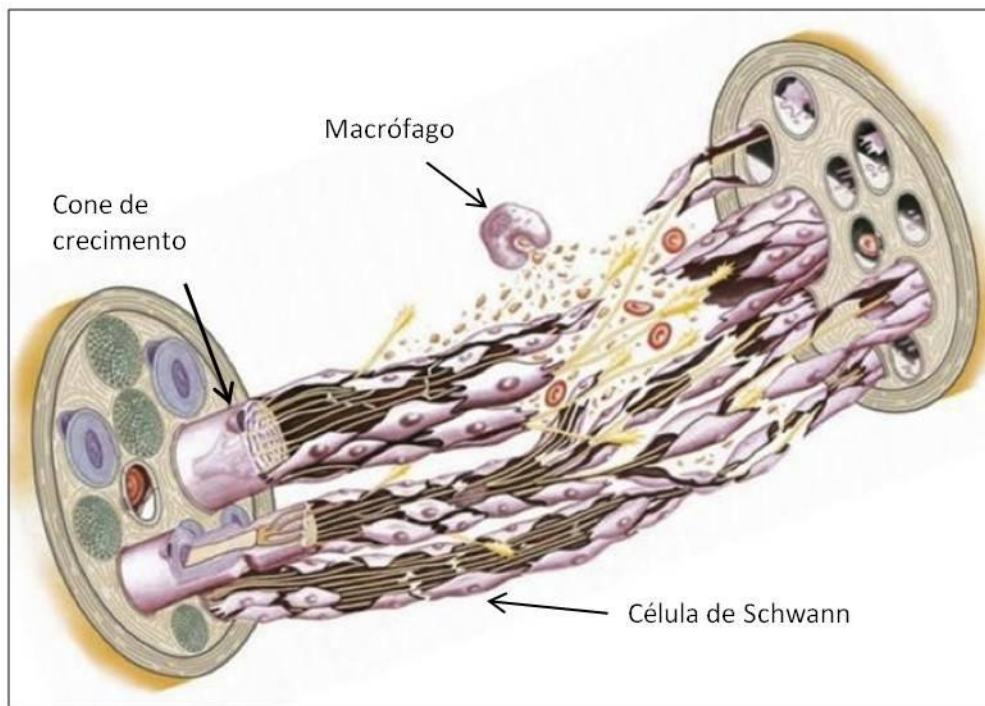


FIGURA 3 – Esquema demonstrando o processo de regeneração nervosa. Observa-se a fagocitose por células do sistema retículo endotelial (macrófagos), brotamento axônico e os cones de crescimento. Fonte: adaptado de MATTAR JUNIOR & AZZE, 2010.

O cone de crescimento possui duas porções: a região do lamelipódio e os filopódios. A região do lamelipódio é definida como a área central da extremidade do cone, que está em constante remodelamento pela formação e retração dos filopódios. Os filopódios são expansões em forma de espículas que se retraem e se estendem a partir da superfície do lamelipódio (YAMADA et al., 1971; LANDIS, 1983). A membrana celular dessas estruturas apresenta grande quantidade de receptores para moléculas de adesão (SANES & JESSELL, 2000).

A adesão entre as células de Schwann e o axônio em crescimento é modulada, em parte, por imunoglobulinas como as moléculas de adesão celular neural (N-CAM) e pelas caderinas. Em um nervo normal há pequenas quantidades de N-CAM na região de contato celular entre as células de Schwann e o axônio. No entanto, na presença de uma lesão, essas moléculas são expressas novamente na superfície das células de Schwann, onde há o contato entre elas durante a fase de proliferação, o mesmo ocorrendo na região de

contato entre essas células e o axônio em crescimento (MARTINI et al., 1994). As caderinas são moléculas de adesão celular que participam também das interações entre os axônios em regeneração e as células de Schwann (EVANS, 2000). Evidências experimentais sugerem que essas moléculas atuam também como mediadoras do metabolismo de elementos do citoesqueleto durante a regeneração (SHIBUYA et al., 1995).

### **1.7 Técnicas de reparação de nervos periféricos**

Dentre as causas de lesões de nervos periféricos o trauma por transecção constitui o mais grave causando, invariavelmente, perda de função do órgão inervado. Essa estrutura quando lesada, raramente apresenta recuperação sem a intervenção cirúrgica para reparo do nervo periférico (OLIVEIRA et al., 2004).

Para esse fim, várias técnicas cirúrgicas são descritas para correção de lesões de nervos periféricos. Dentre elas, ressalta-se a neurorrafia epineural (Figura 4), alongações e enxertos (PINEDO et al., 2001; FOSSUM, 2005). Porém, 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 consequência, resultando na formação de granulomas. Em sua opinião, essas técnicas promovem compressão do nervo pelo fio de sutura e mau direcionamento do tecido endoneural, como observado nos exames histopatológicos.

As colas sintéticas vêm sendo utilizadas em conjunto com a neurorrafia epineural para auxiliar na união de cotos nervosos, diminuindo, portanto, o uso do fio de sutura. Em trabalho realizado por TORRES et al. (2003), a neurorrafia epineural foi complementada com a utilização de cola de fibrina para a neuroanastomose. Segundo o autor, essa técnica foi superior à técnica na qual se utilizou somente o fio de sutura, pois proporcionou bom alinhamento axonal devido à introdução de menos material estranho no tecido neural, o que levou à menor formação de neuroma.

Existem casos em que a extensão da lesão nervosa não permite a simples conexão dos cotos nervosos. Para a correção dessas lesões existem várias técnicas sendo estudadas a fim de proporcionar melhor reparação nervosa. Uma delas é a sutura terminolateral do nervo lesionado, que consiste basicamente em suturar um nervo seccionado em um nervo saudável vizinho para a indução de um brotamento axonal, porém, os resultados foram inferiores ao que se esperava para a utilização dessa técnica na clínica, necessitando de maiores pesquisas na área (GEUNA et al., 2006).

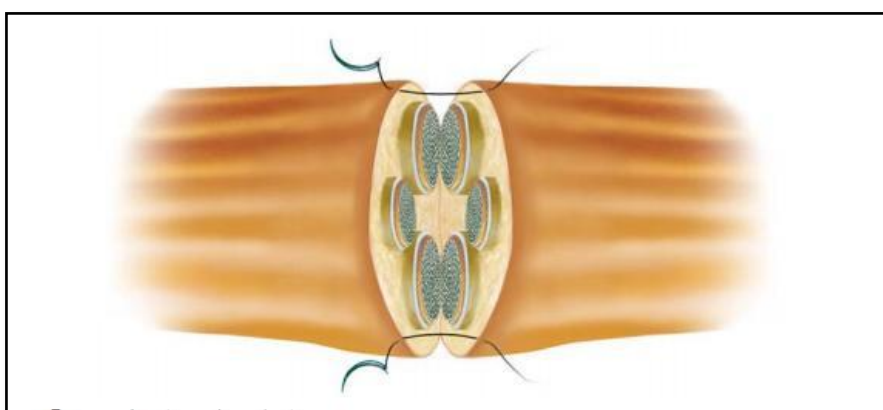


FIGURA 4 – Desenho esquemático de uma neurografia epineural.  
Fonte: MATTAR JUNIOR & AZZE, 2010.

#### 1.7.1 Utilização de implantes e autoenxertos

Nos casos em que o defeito neural é grande o suficiente para não permitir uma simples reunião dos cotos por sutura com fio, a utilização de enxerto de nervo, autólogo ou não, é usada para corrigir lesões (SCHMIDT & LEACH, 2003).

No entanto, a utilização de enxertos de nervos é limitada pelas suas desvantagens, como por exemplo, a disponibilidade de doadores; a necessidade de outra incisão na realização de enxertos autólogos, o que pode complicar o quadro; a incompatibilidade no tamanho do nervo do doador e a possibilidade de formação de neuroma (EVANS, 2000; RUITER et al., 2009). A utilização de enxertos com fatores imunossupressivos é uma opção, porém, as considerações oncológicas e traumáticas limitam o uso dessa técnica (EVANS, 2000).

### 1.7.2 Técnica de tubulização na reparação de nervos periféricos

A tubulização, também chamada guia de nervos ou canais de orientação para os nervos, 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 o direcionamento dos axônios que brotam do coto proximal, a difusão dos fatores de crescimento secretados pela extremidade do nervo lesionado e a redução da infiltração de tecido cicatricial evitando a formação de neuromas (TORRES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; PIERUCCI, 2004).

Estudos da reparação de nervos periféricos em substituição a implantes de aloenxertos e autoenxertos têm sido conseguidos pela técnica de tubulização (Figura 5) (PINEDO et al., 2001). A utilização de diferentes materiais para a confecção de câmara de tubulização vem sendo descrita, dentre esses, pode-se citar o silicone (COLOMÉ et al., 2008), a quitosana (PINEDO et al., 2001) e o ácido poliglicólico (OLIVEIRA et al., 2004; COSTA et al., 2006).

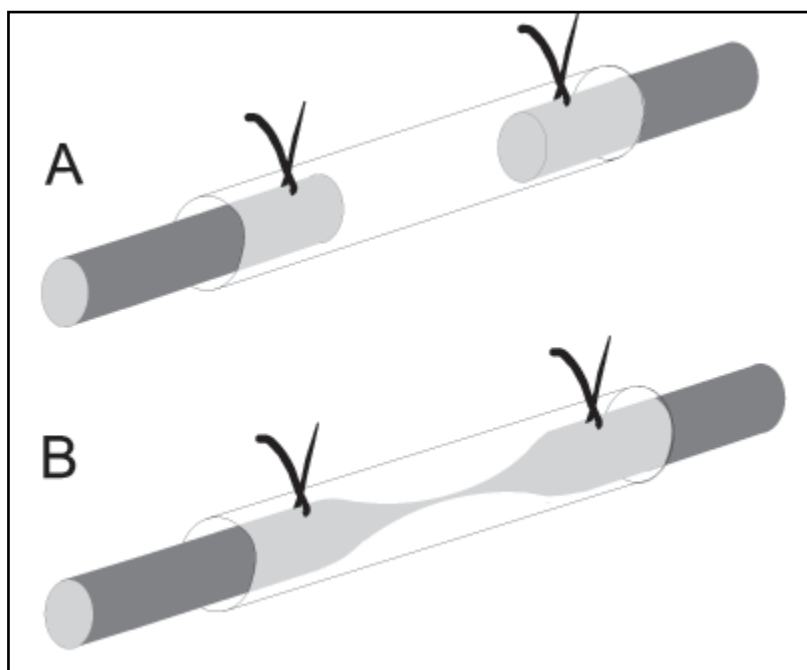


FIGURA 5 - Esquema da técnica de tubulização. (A) Os cotos do nervo são suturados dentro de um tubo oco ficando um espaço entre eles. (B) formação de uma ponte entre os cotos, que inicialmente é formada por matriz de fibrina. Fonte: OLIVEIRA et al., 2004.

Os materiais sintéticos também vêm sendo utilizados para reparação de nervos. Tais materiais são atraentes porque suas características químicas e propriedades físicas (por exemplo, taxa de degradação, porosidade, resistência mecânica) podem ser otimizadas especificamente para uma determinada aplicação. No entanto, a biocompatibilidade de materiais sintéticos representa um desafio, porque a resposta inflamatória do organismo pode variar consideravelmente de um material para outro. Além disso, alguns materiais sintéticos que são tolerados pelo sistema imunológico do corpo são, infelizmente, incompatíveis com a adesão celular e reparação tecidual. Esses materiais são, muitas vezes, modificados para tornarem-se biocompatíveis (SCHMIDT & LEACH, 2003).

Para escolher um material sintético adequado, há várias propriedades que todos os guias de orientação do nervo devem possuir: devem ser facilmente fabricados nas dimensões desejadas; devem ser esterilizáveis; resistentes ao rasgo; de fácil manuseio e sutura. Os materiais permanentes representam maior risco de infecção e são mais susceptíveis de provocar uma resposta inflamatória crônica. Deste modo, um guia de nervo que se degrada enquanto o nervo se regenera se torna mais apropriado (SCHMIDT & LEACH, 2003).

Além dessas técnicas reparadoras de nervos periféricos, utilizando implantes como guias de nervos, estudos atuais objetivam 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, pode-se mencionar a utilização de substâncias exógenas administradas para promover acréscimo na qualidade e velocidade de regeneração (COLOMÉ, 2007). Dentre as substâncias exógenas utilizadas atualmente podemos destacar as células geneticamente modificadas, células-tronco, fatores neurotróficos, culturas de células da glia e macrófagos (SCHMDIT & LEACH, 2003).

## 1.8 Terapia celular

Conceitualmente, a terapia celular é um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas fundamentadas no conhecimento de várias ciências que visam à 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, uma das alternativas terapêuticas mais utilizadas do mundo (ZAGO, 2006).

As pesquisas com terapia celular utilizando as células-tronco constituem uma área bastante explorada nos diversos segmentos da biotecnologia moderna, estando no centro de uma nova área denominada medicina regenerativa. Este crescente interesse está relacionado às possibilidades que essas células oferecem, representando uma revolução nos procedimentos de reparo e regeneração tecidual. Destaca-se ainda seu potencial terapêutico em diversas doenças para as quais ainda não há tratamento eficaz (KUMAR et al., 2005; SCHWINDT et al., 2005).

Uma questão polêmica envolvendo pesquisa com células-tronco é a fonte de onde são retiradas. A célula-tronco adulta autóloga é uma forte candidata para uso terapêutico, podendo permitir aos pesquisadores elaborar ensaios clínicos a custos razoáveis, sem confrontar qualquer questão ética, como as envolvidas no uso de células-tronco embrionárias, além de evitar reações imunológicas que comprometeriam o transplante (BRAGA-SILVA et al, 2006).

## 1.9 Células-tronco

As células-tronco (CT) são células que possuem habilidade única de se auto-renovar e potencial de diferenciação em diferentes tipos de células maduras. Essas características representam, portanto, um papel essencial no desenvolvimento embrionário e na regeneração tecidual (LI & XIE, 2005).

As células-tronco são em geral classificadas como embrionárias e adultas ou somáticas. As células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas do blastocisto e são consideradas pluripotentes, isto é, têm a capacidade de originar

células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma. Já as células-tronco adultas ou somáticas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados (especializados) (KAJI & LEIDEN, 2001). As funções e características destes tipos de células são diferentes de acordo com a plasticidade que cada uma representa.

A plasticidade é definida como a capacidade que uma CT apresenta em originar células diferenciadas de outros tecidos, como por exemplo, quando células-tronco hematopoiéticas originam as células musculares cardíacas ou hepatócitos. Ou seja, a plasticidade é a capacidade de transdiferenciação (ZAGO, 2006). De acordo com essa capacidade de diferenciação as CT classificam-se em totipotentes, pluripotentes e multipotentes (SOUZA et al., 2003).

#### 1.9.1 Células-tronco totipotentes

São chamadas de totipotentes as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto e o blastômero. Como exemplo, pode-se mencionar uma célula-ovo, um óvulo fecundado ou uma célula obtida a partir da transferência de núcleo somático. Este tipo celular se encontra no ápice da hierarquia das CT, pois são as únicas que conseguem se diferenciar em todos os tipos de tecidos, inclusive placenta e anexos embrionários (ZAGO, 2006; COLOMÉ, 2007).

#### 1.9.2 Células-tronco pluripotentes

As células pluripotentes podem se diferenciar em todos os tipos celulares que formam um embrião e indivíduo adulto, com exceção das membranas embrionárias, placenta e anexos embrionários. São provenientes da massa interna do blastocisto, sendo também denominadas de CT embrionárias e são capazes de dar origem a mais de 250 tipos de tecidos do adulto. Assim, podem originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo por não terem a capacidade de gerar as membranas embrionárias. (SCHWINDT et al., 2005; ZAGO, 2006; COLOMÉ, 2007). Estas células também podem ser encontradas em indivíduos adultos, porém em pequena quantidade.

São provenientes da medula óssea e podem originar células de diferentes tecidos (GAGE, 2000).

### 1.9.3 Células-tronco multipotentes

As células-tronco multipotentes são um pouco mais diferenciadas do que as pluripotentes. No indivíduo adulto estas possuem a capacidade de originar apenas um limitado número de tipos celulares. Normalmente originam células de um subgrupo de linhagens celulares do mesmo folheto embrionário, como as células-tronco mesenquimais (CTM), as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco neurais (ZATZ, 2004; MEIRELES et al., 2006; NARDI & MEIRELES, 2006).

## 1.10 Células-tronco da medula óssea

A medula óssea (MO) possui uma diversidade de células adultas que incluem: células maduras do sangue, linfócitos, fragmentos de estroma, gordura e as células-tronco hematopoiéticas. Além desta variedade celular, ainda há uma população rara de células-tronco multipotenciais capazes de suportar a hematopoese e se diferenciar em diversas linhagens celulares denominadas de células-tronco mesenquimais (CTM) (COVAS, 2006; NARDI & ALFONSO, 2006). Porém, já foi identificada uma população que se diferencia em células endoteliais como sendo originária da medula óssea. Assim, a MO parece conter três tipos de populações de células-tronco: hematopoiéticas, estromais ou mesenquimais e possivelmente progenitoras endoteliais (SHI et al., 1998).

As células-tronco hematopoiéticas são células indiferenciadas e responsáveis pela reposição de células maduras no sangue. Estas células são consideradas raras e por existirem em pequena quantidade no organismo, é admirável a capacidade de produção deste sistema. Estas CT também circulam no sangue de adultos e de fetos e, no momento do nascimento, o sangue fetal retido na placenta pode ser recuperado e utilizado para fins terapêuticos (ZAGO, 2006).

As CTM são um dos mais interessantes tipos de células-tronco adultas (NARDI & MEIRELLES, 2006). Foram inicialmente identificadas por FRIEDENSTEIN et al (1968) e, desde então, as CTM atraíram o interesse de muita pesquisa devido ao seu potencial na terapia de várias enfermidades incluindo lesão neural e degeneração (WANG et al., 2009). Dentre todas as linhagens, as CTM apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não-mesodermis (ZAGO & COVAS, 2004; MEIRELLES et al., 2006). Essas células podem ser transplantadas para os sítios lesionais logo após a ocorrência da lesão tecidual e podem ser aplicadas na forma indiferenciada, recebendo o estímulo do meio para posterior diferenciação, ou sofrer diferenciação em cultura antes da implantação (DEL CARLO et al., 2004, DEL CARLO et al., 2008).

### **1.11 Células-tronco na regeneração neural**

A utilização de células-tronco da medula em casos de lesões em nervos periféricos é considerada uma das alternativas mais promissoras em relação às alternativas referentes ao tratamento de lesões nervosas. Afinal, estas preenchem uma lacuna terapêutica entre a possibilidade de realização de reparo primário, muitas vezes não possível devido à perda nervosa significativa, e a realização de outras técnicas como auto-enxerto autólogo, que, por sua vez, está associada, muitas vezes, a dificuldades técnicas que impossibilitam a realização de tal técnica pelo cirurgião (BRAGA-SILVA et al., 2006). Um estudo desenvolvido por BRAGA-SILVA et al. (2006) comparando plasma rico em plaquetas e células-tronco da medula óssea na regeneração de nervo periférico de ratos, demonstrou que a utilização de células-tronco não somente é uma alternativa significativa, bem como apresenta resultados superiores em relação a outras técnicas também realizadas.

Outro estudo realizado por CHEN et al. (2007) mostrou o benefício do emprego dos aspirados de medula óssea no tecido nervoso lesionado em ratos. Além disso, COLOMÉ et al. (2008), ao utilizar células mononucleares de medula óssea na regeneração de nervo tibial em coelhos constataram que o processo

regenerativo acontece de forma mais rápida no grupo tratado com células mononucleares autólogas de medula óssea.

## **1.12 OBJETIVOS**

### 1.12.1 Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de regeneração nervosa periférica após defeito agudo do nervo tibial de coelhos da raça Nova Zelândia, corrigido mediante a técnica de tubulização, associada ou não a inoculação de células mononucleares autólogas de medula óssea no sitio da lesão.

### 1.12.2 Específicos

- Avaliar, clinicamente, a efetividade da técnica de planimetria plantar.
- Avaliar, clinicamente, o retorno da função nervosa na locomoção dos animais.
- Analisar microscopicamente e morfometricamente a regeneração das amostras do nervo tibial de coelhos.
- Comparar a regeneração do nervo tibial de coelhos das amostras tratadas com células mononucleares de medula óssea com os animais não tratados.

## REFERÊNCIAS

1. BRAGA-SILVA, J.; GEHLEN, D.; ROMAN, J.A.; MENTA, C.; ATKINSON, E.A.; MACHADO, D.C.; VIEZZER, C.; BARBOSA, G.L.; BAES, C.V.W.; SILVA, V.D.; COSTA, J.C. 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**, São Paulo, v.14, n.5, p. 273-275, 2006.
2. BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgery Focus**, Charlottesville, v.16, n.5, p. 01-07, 2004.
3. CHEN, Y.S.; HSIEH, C.L.; TSAI, C.C.; CHEN, T.H.; CHENG, W.C.; HU, C.L.; YAO, C.H. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. **Biomaterials**, Winston-Salem, v. 21, n. 15, p. 1541-1547, 2000.
4. CHEN, C.J.; OU, Y.C.; LIAO, S.L.; CHEN, W.Y.; CHEN, S.Y.; WU, C.W.; WANG, C.C.; WANG, W.Y.; HUANG, Y.S.; HSU, S.H. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. **Experimental Neurology**, New York, v.204, p. 443-453, 2007
5. COLOMÉ, L. M. **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**. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
6. COLOMÉ, L.M.; GOMES, C.; CROSIAN, N.; PAZ, A.H.; LUGO, A.A.; GUIMARÃES, K.M.; FOERSTROW, L.P.; TESSARI, J. P.; COLOMÉ, L. M.; GRAÇA, D.L.; MEURER, L.; PASSOS, E.P.; PIPPI, N. L.; CONTESINI, E.A.; LIMA, E. O.C. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, p.2529-2534, 2008.
7. CORTES, M. R.; SANDOVAL, J. P.; PINEDA, J. B.; ESTRADA, R. S.; RODILES, C. C. G.; RODRIGUEZ, E. A, ZAITSEVA, G. P.; LOPEZ, M. L. P. Immunological Study of a Chitosan prostheses in the Sciatic nerve Regeneration of the Axotomized Dog. **Journal of Biomaterials Applications**, London, v.18, p. 15-18, 2003
8. COSTA, M. P.; CUNHA, A. S.; SILVA, C. F.; FILHO, T. E. P. B.; FERREIRA, M. C. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.14, n.1, p.25-29, 2006.
9. COVAS, D. T. Células tronco mesenquimais. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Ateneu, 2006. p.35-48.
10. CUNNINGHAM, J. G. O neurônio. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2004. Cap.3, p.35-41.

11. DAZA, C. H. M.; RENGIFO, Y. R.; RUBIO, J. J. S.; ALZATE, L. H.; HURTADO, H. 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**, Bogotá, v.13, n.3, p.285-292, 1999.
12. DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M. Célulastronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, n.11, p.167-169, 2008.
13. DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; DAIBERT, A. P. F.; PINHEIRO, L. C. P. Medula óssea autógena. Uma alternativa em ortopedia veterinária. **Revista Ceres**, Viçosa, n.51, p. 411-418, 2004.
14. EVANS, G. R. D. Challenges to nerve regeneration. **Seminars in Surgical Oncology**, New York, n. 19, p. 312–318, 2000.
15. FOSSUM, T. W. Cirurgia dos nervos periféricos. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 43, p.1336-1350.
16. FRIEDENSTEIN, A. J.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, New York, v.06, p.230-247, 1968.
17. GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, New York, v.287, p.1433-1438, 2000.
18. GEUNA, S.; PAPALIAB, I.; TOSC, P. End-to-side (terminolateral) nerve regeneration: A challenge for neuroscientists coming from an intriguing nerve repair concept. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v.52, p.381 – 388, 2006.
19. GRECCO, M.A.S.; LEITE, V.M.; ALBERTONI, W.M.; SANTOS, J.B.G.; HIRAKAWA, C. K.; FALOPPA, F.; VALENTE, S.G. Estudo da regeneração nervosa em nervos tibiais de ratos Wistar utilizando o Fluoro-Gold® como marcador neuronal. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.11, n.04, p.225-229, 2003.
20. GUO, B.F.; DONG, M. M. Application of neural stem cells in tissue-engineered artificial nerve. **Otolaryngology-head and Neck Surgery**, Alexandria, v.140, p.159-164, 2009.
21. HAM, A. W.; CORMACK, D. H. Nervous Tissue. In: HAM, A. W.; CORMACK, D. H. **Histology**. 8. ed. Philadelphia: Lippincott, 1979. cap. 17, p. 483-539.
22. JIANG M., ZHUGE, X.; YANG, Y.; GU, X.; DING, F. The promotion of peripheral nerve regeneration by chitooligosaccharides in the rat nerve crush injury model. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v.454, p. 239-243, 2009.
23. KAJI, E.H.; LEIDEN, J.M. Gene and stem cell therapies. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.285, p.545-555, 2001.
24. KANDEL, E. R. Nerve Cells and Behavior. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T, M. **Principles of neural science**. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 2000. cap. 2, p.19-35.

25. KIEFER, R.; KIESEIERB, B. C.; STOLLG, G.; HARTUNG, H. P. The role of macrophages in immune mediated damage to the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v.64, n.2, p.109-127, 2001.
26. KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. In: KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran. Pathologic basis of disease**. 7ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. Cap.3, p 91-94.
27. LANDIS, S. C. Neuronal growth cones. **Annual review of physiology**, Palo Alto, v.45, p.567-580, 1983.
28. LE BEAU, J. M.; LA CORBIERE, M.; POWELL, H. C. ELLISMAN, M. H.; SCHUBERT, D. Extracellular fluid conditioned during peripheral nerve regeneration stimulates Schwann cell adhesion, migration and proliferation. **Brain Research**, Amsterdam, v.459, p.93-104, 1988.
29. LENT, R. Primeiros conceitos da neurociência. In: LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**. São Paulo: Ateneu, 2005. Cap.1, p.3-28.
30. LI, L; XIE, T. Stem Cell Niche: Structure and Function. **The Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 21, p. 605-631, 2005.
31. LUNN, E. R.; BROWN, M. C.; PERRY, V. H. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. **Neuroscience**, Oxford, v.35, n.1, p.157-165, 1989.
32. MAKWANA, M.; RAIVICH, G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 272, p.2628–2638, 2005.
33. MARTINI, R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. **Journal of Neurocytology**, Norwel, v.23, p.1-28, 1994.
34. MARTINS, R. S., SIQUEIRA, M. G.; DA SILVA, C. F.; PLESE, J. P. P. Mecanismos básicos da regeneração de nervos. **Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 20-25, 2005.
35. MATTAR JUNIOR, R.; AZZE, R.J. Lesões de nervos periféricos. In: Atualização em traumatologia do aparelho locomotor. Disponível em: <http://www.ronaldoazze.com.br/fasciculo/fasciculo3.PDF>. Acessado em 23/11/2010.
36. MEIRELLES, L. C.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, London, v.119, n.11, p.2204-2213, 2006.
37. NARDI, N. B.; ALFONSO, Z. C. Células tronco hematopoiéticas. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p.49-45
38. NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook Experimental Pharmacology**, New York, v.174, n. 6, p.249–282, 2006.

39. OLIVEIRA, A. L. R.; PIERUCCI, A.; PEREIRA, K. B. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 225-231, 2004.
40. ORTIZ-HIDALGO, C.; WELLER, R. O. Peripheral Nervous System. In: STERNBERG, S. S. **Histology for Pathologists**. Philadelphia: Lippincott, 1997. cap. 12, p. 285-311.
41. PIERUCCI, A. **Influencia do agrecam sobre a migração das células de Schwann in vitro e regeneração nervosa periférica in vivo após transecção do nervo ciático**. 2004. 132f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
42. PINEDO, U. G.; DELGADO, E. C.; DELLAMARY, F. L.; GALINDO, M. J.; PEREZ, O. G.; CONTRERAS, A. M.; PINEDA, J. B.; RUIZ, A. N.; LUQUIN, S.; ISLAS, M. M.; ESTRADA, J. G. Utilización de prótesis de quitosana y silicona em La regeneración del nervio ciático axotomizado de ratas. **Archivos de neurociencias mexicanas**, Cidade do México, v.6, n. 4, p.184-193, 2001.
43. RIET-CORREA, G. R. **Morfologia das lesões induzidas pelo Brometo de Etídio no nervo ciático de ratos Wistar**. 2001. 57 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
44. RUITER, G. C. W.; SPINNER, R. J.; YASZEMSKI, M. J.; WINDEBANK, A. J.; MALESSY, M. J. A. Nerve tubes for peripheral nerve repair neurosurgery. **Clinical North America**, St. Louis, v.20, p.91-105, 2009.
45. RUTKOWISK, J. L.; TUIE, G. F.; LINCON, P. M.; BOYER, P. J.; TENNEKON, G. I.; KUNKEL, S. L. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v.101, p.47-60, 1999.
46. SANES, J.; JESSELL, T. M. The Guidance of Axons to their Targets. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T, M. **Principles of neural science**. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 2000. Cap.54, p.1063-1086.
47. SANTOS, X.; RODRIGO, J.; HONTANILLA, B.; BILBAO, G. Local administration of neurotrophic growth factor in subcutaneous silicon chambers enhances the regeneration of the sensory component of the rat sciatic nerve. **Microsurgery**, San Francisco, v. 19, n. 6, p. 275-280, 1999.
48. SCHMIDT, C. E.; LEACH, J. B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. **Annual Review Biomedical Engineering**, Palo Alto, v.5, p. 293–347, 2003.
49. SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.13-19, 2005.
50. SHI, Q.; RAFII, S. WU, M. H.; WIJELATH, E. S.; YU, C.; ISHIDA, A.; FUJITA, Y.; KOTHARI, S.; MOHLE, R.; SAUVAGE, L. R.; MOORE, M. A. S.; STORB, R. F.; HAMMOND, W.P. Evidence for circulation Bone Marrow-Derived endothelial Cells. **Blood**, New York, v.92, p.362-367, 1998.
51. SHIBUYA, Y.; MIZOGUCHI, A.; TAKEICHI, M.; SHIMADA, K.; IDE, C. Localization of N-cadherin in the normal and regenerating nerve fibers of the

- chicken peripheral nervous system. **Neuroscience**, Oxford, v.67, p.253-61, 1995.
52. SOUZA, V. F.; LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. A.; RAMALHO, L. M. P.; SANTOS, J. N. Células-tronco: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.2, n.2, p.251-256, 2003.
  53. STOLL, G.; GRIFFIN, J. W.; LI, C. Y.; TRAPP, B. D. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in treatment. **Journal of Neurocytology**, London, v.18, n.5, p.671-683, 1989.
  54. TASHIRO, T.; KOMIYA, Y. Changes in organization and axonal transport of cytoskeletal proteins during regeneration. **Journal of Neurochemical**, Malden, v. 56, p.1557-63, 1991.
  55. TERENCE, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of Anatomy**, London, v.194, p.1- 14, 1999.
  56. 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<sup>®</sup> em ratos Wistar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.5, p. 557-561, 2003.
  57. WANG, A.; AO, Q.; HE, Q.; GONG, X.; GONG, K.; GONG, Y.; ZHAO N. ZHANG, X. Neural Stem Cell Affinity of Chitosan and feasibility of Chitosan-based porous Conduits as scaffolds for nerve tissue engineering. **Tsinghua Science and Technology**, Beijing, v.11, n.4, p. 415-420, 2006.
  58. WANG, J.; DING, F.; GU, Y.; LIU, J.; GU, X. Bone Marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1262, p. 7-15, 2009.
  59. XU, J.; LIU, L.; BARANA, A.; DALOZE, P.; HEBERT, M.; QI, S. Acellular nerve allografting combined with mesenchymal stem cells improves peripheral nerve regeneration and functional recovery in a rat sciatic nerve defective model. **Transplantation**, New York, v.90, n. 2S, p.1046, 2010.
  60. YAMADA, K. M.; SPOONER, B. S.; WESSELLS, N. K. Ultrastructure and function of the growth cones and axons of cultured nerve cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 49, p.614-35, 1971.
  61. ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, 23 p.
  62. 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, 2006, p. 03-20.
  63. ZATZ, M. **Clonagem e célula tronco**. Estudos avançados, São Paulo, v.18, n. 51, 2004.
  64. ZIGMOND, R. E. Can galanin also be considered as growth-associated protein 3.2 ? **Trends in Neuroscience**, Amsterdam, v.24, n.9, p.494-5, 2001.

## **CAPÍTULO 2 – CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA NA REGENERAÇÃO DO NERVO TIBIAL DE COELHOS SUBMETIDOS À NEURECTOMIA: ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS**

### **RESUMO**

A recuperação funcional de nervos periféricos após lesão é o principal objetivo da intervenção terapêutica. Por isso o objetivo deste estudo foi avaliar clinicamente a recuperação funcional de coelhos após neurectomia e tratamento com células mononucleares de medula óssea associada à técnica de tubulização. Foram utilizados para isto, 24 coelhos da raça Nova Zelândia, alocados em dois grupos com 12 animais cada, denominados grupo célula mononuclear (GCM) e grupo solução salina (GSS). Os coelhos foram submetidos à secção do nervo tibial direito e reparação por meio da técnica de tubulização utilizando tubo oco de silicone, para então, receberem no interior do tubo, 0,1mL de suspensão de células mononucleares autólogas de medula óssea ( $2 \times 10^6$  células) no GCM e solução salina no GSS, para comparação da evolução da recuperação funcional dos membros operados. Foram realizadas avaliações da marcha e planimetria da pegada do membro pélvico impressa em papel a partir de tinta à base d'água aplicada à área plantar, antes (M0) e após o 7º (M7), 15º (M15), 30º (M30), 45º (M45) e 60º (M60) dias do procedimento cirúrgico. Os resultados mostraram que não houve a recuperação funcional do nervo tibial em ambos os grupos, sem diferença entre eles nos diferentes momentos e entre os momentos dentro dos grupos, exceto quando comparado com M0.

**Palavras-chave:** implante autólogo, regeneração tecidual, terapia celular

## CHAPTER 2 – AUTOLOGOUS MONONUCLEAR BONE MARROW CELLS IN THE REGENERATION OF TIBIAL NERVE OF RABBITS SUBMITTED TO NEURECTOMY: MORPHOFUNCTIONAL ASPECTS

### ABSTRACT

The functional recovery after peripheral nerve injury is the main goal of therapeutic intervention. Therefore the aim of this study was to clinically evaluate functional recovery in rabbits after neurectomy and treatment with bone marrow mononuclear cells associated with the tubulization technique. For this, 24 New Zealand rabbits, were used. They were divided into two groups with 12 animals each, mononuclear cell group (MCG) and saline group (SSG). The rabbits underwent right tibial nerve section and repair by the tubulization technique using silicone hollow tube, which received 0.1 ml of autologous mononuclear bone marrow cells ( $2 \times 10^6$  cells) in the MCG and of saline solution in the SSG, in order to compare the evolution of functional recovery of the operated limbs. Gait and planimetry were performed. Planimetry of the pelvic limb footprint printed on paper with water-based ink applied to the plantar area, before (M0) and after 7 (M7), 15 (M15), 30 (M30), 45 (M45) and 60 (M60) days after surgery. The results showed no functional recovery of the tibial nerve in both groups, without differences between them in different times and among times within groups, except when compared to M0.

**Keywords:** autologous implantation, cellular therapy, tissue regeneration

### INTRODUÇÃO

As lesões de nervos periféricos geralmente levam a grande perda da função motora e sensorial. Devido às complexas exigências para uma regeneração axonal adequada, a recuperação funcional raramente ocorre. Os modelos experimentais são uma ferramenta útil para investigar os mecanismos relacionados à regeneração axonal, reinervação e para testar novas estratégias para permitir o restabelecimento da função nervosa (NAVARRO & UDINA, 2009).

A recuperação funcional é um dos principais objetivos da intervenção terapêutica em lesões de nervos periféricos (COSTA et al., 2009) e, para que ocorra satisfatoriamente, é necessário que haja adequada regeneração do nervo

lesionado. Neste sentido, a utilização de células-tronco vem se tornando uma alternativa, pois estas células são fonte promissora de proliferação e diferenciação celular (NEIVA, 2005), sendo a medula óssea, a local mais acessível de sua obtenção por meio das células mononucleares (ZAGO & COVAS, 2004).

Para avaliar a contribuição que estas células trazem na recuperação tecidual e principalmente funcional de nervos periféricos a avaliação clínica é de fundamental importância. TRINDADE (2009) avaliou a marcha de coelhos submetidos à lesão do nervo femoral, adaptando os parâmetros de claudicação dos cães por não haver na literatura parâmetros para espécie em questão. Além disso, testes que avaliam o índice funcional de nervos periféricos também têm sido amplamente aplicados em ratos. DeMEDINACELI et al. (1982) desenvolveram um método avaliativo quantitativo, confiável e reprodutível, da condição funcional do nervo ciático de ratos, para a avaliação do grau de lesão e da recuperação, denominado de Índice Funcional do Ciático. Este método consiste em analisar as impressões das pegadas dos animais, contudo, não há descrição de sua validade na análise de pegadas de coelhos, uma espécie empregada também nos estudos de regeneração nervosa.

Assim exposto, este trabalho objetivou, por meio de um modelo experimental, verificar se a terapia celular com células mononucleares autólogas providas da medula óssea, em associação com a técnica de tubulização, possui efeitos na recuperação funcional do nervo tibial em coelhos da raça Nova Zelândia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi desenvolvido na Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) no período de julho a outubro de 2010, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, protocolo nº10/2009. Na pesquisa foram empregados 24 coelhos da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas, saudáveis, pesando aproximadamente 3,0kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais onde recebiam água *ad libitum* e

ração segundo recomendação do fabricante (Ração do Sítio Coelho<sup>®</sup> - Guabi Nutrição Animal, Anápolis – Go).

Os animais foram submetidos a um período de condicionamento de 40 dias para se acostumarem à manipulação e a caminhar por um corredor de madeira construído para avaliação clínica pós-operatória da locomoção. Os coelhos foram alocados em dois grupos com 12 animais cada, com a seguinte denominação, grupo célula mononucleares (GCM) e grupo solução salina (GSS). Os coelhos do GCM foram tratados com células mononucleares autólogas obtidas de medula óssea e os coelhos do GSS receberam solução salina (solução de cloreto de sódio a 0,9%) na reparação do nervo tibial, conforme protocolo a seguir.

Para o procedimento de colheita e isolamento da fração mononuclear da medula óssea, os animais foram submetidos à anestesia injetável com uma associação de 1,0mg/kg de sulfato de morfina (Dimorf<sup>®</sup>, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira/SP), 1,0mg/kg de cloridrato de xilazina (Calmiun<sup>®</sup>, Agener União, São Paulo/SP); 2,0mg/Kg de cloridrato de midazolan (Midazolan<sup>®</sup>, União Química, Jabaquara/SP) e 30mg/kg de cloridrato de cetamina (Ketamina<sup>®</sup>, Agener União, São Paulo/SP), por via intramuscular. Após o decúbito lateral, procedeu-se a canulação da veia auricular lateral com cateter 24G. Durante todo o período de anestesia foi fornecido oxigênio, por máscara facial, com fluxo de 2L/min. Em seguida realizou-se tricotomia na região do tubérculo umeral para a colheita de medula óssea.

Sequencialmente, com o animal em decúbito lateral, foi realizada flexão da articulação escápulo-umeral e introdução de uma agulha hipodérmica 25X8G previamente heparinizada na região do tubérculo umeral. Com uma seringa de 10 ml também previamente heparinizada colheu-se em média 5 ml de medula óssea íntegra. Em seguida, o material foi encaminhado ao Laboratório do Departamento de Genética e Citogenética, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, para isolamento, determinação do rendimento e da viabilidade das células mononucleares segundo protocolo descrito por OLIVEIRA (2009) e SOUZA (2009).

Os aspirados de medula óssea foram colocados individualmente em tubos estéreis de 15 mL tipo Falcon e adicionou-se solução salina tamponada de

Dulbecco (DPBS). A solução formada foi adicionada lentamente sobre uma solução Ficoll-HypaquePlus (Histopaque 1077 – Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) em outro tubo Falcon, para separação das células-tronco mononucleares. \

Essa nova solução foi centrifugada durante 30 minutos a 15°C para separação das células mononucleares. Essas células foram colhidas com o auxílio de pipeta Pasteur e transferidas para um novo tubo estéril de 15mL.

Após esta etapa, adicionou-se à amostra 1,0mL de tampão de lise de eritrócitos durante cinco minutos. Uma terceira lavagem foi realizada com a adição de 10 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente desprezado, permanecendo aderido no fundo do tubo apenas o aglomerado celular. Adicionou-se ao sedimento celular a quantidade necessária do meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, até que a amostra atingisse o volume total de 500µl. Deste volume, uma alíquota de 10µl da suspensão foi adicionada a 10µl do corante azul de Tripán em um tubo de Eppendorf para contagem das células em câmara hemocitométrica de Neubauer. A viabilidade foi determinada por técnica de exclusão vital, ou seja, das células não coradas por azul de Tripán.

No intuito de padronizar a quantidade de células inoculadas no interior do tubo de silicone, foi obtido o fator de diluição de cada amostra por meio de cálculo demonstrado no Quadro 1. Obteve-se um volume final de aproximadamente 0,1ml contendo  $2 \times 10^6$  células mononucleares. Os volumes finais foram armazenados em seringas estéreis de 1,0mL, mantidas em refrigeração até o momento da aplicação nos procedimentos cirúrgicos.

QUADRO 1 - Equações matemáticas para a determinação do número de células, viabilidade celular e do fator de diluição para o processo de isolamento, contagem e viabilidade das células-tronco mononucleares.

DESCRIÇÃO	FÓRMULA
<b>Cálculo do número de células por mililitro (NC)</b>	<p><b><math>NC=V \times FN \times FT/\#Q</math></b></p> <p>Onde: V = número de células viáveis contadas; FN = fator da câmara de Neubauer (<math>10^4</math>); FT = fator de diluição do Azul de Tripán (2); #Q = número de quadrantes da câmara utilizados para a contagem.</p>
<b>Cálculo da viabilidade celular determinada em porcentagem (VC)</b>	<p><b><math>VC=V \times 100/NT</math></b></p> <p>Onde: NT = número total de células (viáveis e não viáveis)</p>
<b>Determinação do fator de diluição (FD)</b>	<p><b><math>FD = QT / CT</math></b></p> <p>Onde: QT = quantidade de células viáveis presente em 500µl do sedimento celular; CT = quantidade de células a serem transplantadas (<math>2 \times 10^6</math>).</p> <p><b><math>VF=VI/FD</math></b></p> <p>Onde: VF= volume final; VI = volume inicial do inoculado (500µl) FD = fator de diluição</p>

Fonte: adaptado de Oliveira, 2009.

Para o procedimento cirúrgico além do protocolo anestésico utilizado para a colheita de medula óssea, realizou-se anestesia epidural entre a última vértebra lombar e a primeira vértebra sacral, empregando uma associação de 5,0mg/kg de cloridrato de lidocaína sem vasoconstritor a 2% (Anestésico L<sup>®</sup>, Pearson, Eurofarma, São Paulo/SP) e 0,6mg/kg de cloridrato de bupivacaína sem vasoconstritor a 0,5% (Neocaína<sup>®</sup>, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira/SP) tomando o cuidado para não ultrapassar o volume de 0,25mL/kg, como descrito rotineiramente para outras espécies domésticas (SKARDA & TRANQUILI, 2007).

Posteriormente, com o animal posicionado em decúbito lateral direito, foi realizada tricotomia na face do membro (Figura 1A), antisepsia de pele com a aplicação seqüencial de álcool, iodopovidona e álcool e, realizado o acesso cirúrgico pela face lateral da coxa (Figura 1B). Após incisão na fáscia lata (Figura 1C) e afastamento dos ventres dos músculos vasto lateral e bíceps femoral, foi localizado o nervo ciático e suas ramificações. Com auxílio de instrumental

microcirúrgico o nervo ciático foi dissecado de seu leito, isolando a porção tibial (Figura 1D) identificada por se localizar mais cranialmente em relação ao nervo fibular. Por meio da secção aguda com lâmina de bisturi foi criado um defeito nervoso de 5 mm no terço médio de seu comprimento exposto pela ferida cirúrgica. Em seguida, as extremidades de um tubo oco de silicone (Medicone<sup>®</sup>, Fibra cirúrgica, Cachoeirinha/RS) medindo 1,5 mm e 2,42 mm de diâmetro interno e externo, respectivamente, e 15 mm de comprimento, foram fixadas à camada epineural das extremidades dos cotos do nervo com fio monofilamentar de náilon, calibre 6-0 (Technofio<sup>®</sup> - Ace Ind. e Com., Goiânia/GO) em padrão interrompido simples (Figura 1E).

No espaço entre os cotos do nervo tibial delimitado pelo lúmen do tubo de silicone, foi injetada a fração de células mononucleares autólogas de medula óssea em um volume de 0,1ml no GCM (Figura 1F). Nos animais do grupo GSS foi injetado o mesmo volume de solução de cloreto de sódio a 0,9%, conforme previamente descrito. No pós-operatório, foi administrado antibiótico a base de cefazolina sódica, 30 mg/kg, por via IM, de 12/12 horas durante sete dias. Para analgesia, foi utilizado o cloridrato de tramadol (Cloridrato de tramadol<sup>®</sup>, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Pouso Alegre/MG) 2,0mg/kg, via subcutânea, de 12 em 12 horas, durante os três primeiros dias. Os curativos da ferida cirúrgica foram realizados uma vez ao dia, com gazes umedecidas em solução de cloreto de sódio à 0,9%, por 10 dias. Durante o período pós-operatório os coelhos foram mantidos com colar elizabetano.

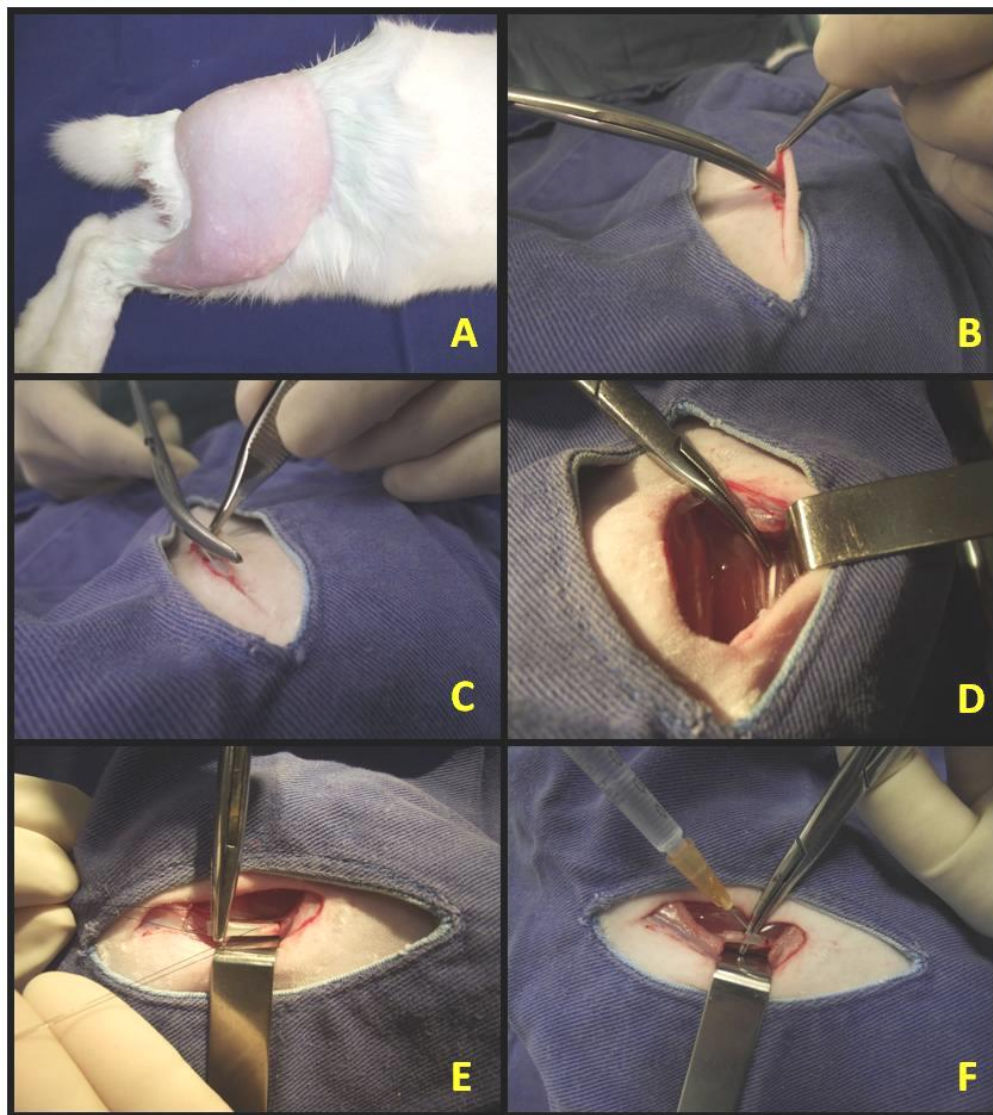


FIGURA 1 – Etapas do procedimento cirúrgico de lesão experimental e reparação pela técnica de tubulização, do nervo tibial em coelho. A) tricotomia ampla no membro pélvico direito para o acesso cirúrgico demonstrado na linha pontilhada; B) incisão de pele e subcutâneo; C) incisão da fascia lata; D) isolamento da porção tibial do nervo ciático; E) introdução do coto nervoso no interior do tubo de silicone; F) aplicação das células mononucleares ou solução fisiológica no interior do tubo de silicone.

Para a avaliação clínica da locomoção os coelhos foram colocados em um corredor de 2m de comprimento e 0,25m de largura e a imagem foi vídeo-documentada por meio de uma câmera filmadora digital para posterior avaliação da marcha (Figura 2A). Foram analisadas seis passadas por animal e estabeleceu-se um escore de frequência de passos com déficit de flexão, que foi assim constituído: grau 0 – passos sem déficit de flexão; grau 1 - um a dois

passos com déficit; grau 2 - três a quatro passos com déficit; e grau 3 - cinco a seis passos com déficit.

Posteriormente à avaliação da marcha foi realizado a planimetria tingindo a região plantar dos membros pélvicos dos coelhos com tinta a base d'água e os coelhos foram colocados para caminhar pelo corredor utilizado para avaliação clínica. Utilizou-se papel branco com o objetivo de realizar o registro da pegada de cada membro delimitada pela tinta impregnada nele (Figura 2B). As impressões dos pontos de apoio do membro operado e do membro contralateral foram escaneadas e analisadas no programa *Image J* (National Institutes of Health, United States of America, <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). As avaliações da marcha e a planimetria foram realizadas antes do procedimento cirúrgico (M0) e aos sete (M7), 15(M15), 30(M30), 45(M45) e 60(M60) dias após o procedimento cirúrgico.

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney para a avaliação da marcha e Análise de Variância em parcelas subdivididas para avaliação das pegadas. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A colheita de medula óssea através do tubérculo umeral não causou nenhum tipo de alteração locomotora nos animais ou outros tipos de alterações. Na colheita foi possível a obtenção de quantidade suficiente de medula óssea íntegra e após o processo de separação, contagem e determinação da viabilidade das células mononucleares se obtiveram uma média de  $13,45 \times 10^6$  células por animal com viabilidade média de 95,37%.

Em relação ao procedimento cirúrgico, não houve dificuldade no acesso ao nervo tibial, nem na execução da técnica de tubulização. Além disso, no pós-operatório houve completa cicatrização da ferida cirúrgica em todos os animais sem alterações como secreção, hiperemia ou deiscência da ferida. No entanto, durante o período de avaliação foi observado no membro operado de

seis animais de cada grupo uma pododermatite ulcerativa na região da articulação tibiotársica.

As avaliações clínicas da marcha foram realizadas sempre pelo mesmo observador em todos os momentos. Os valores dos escores dos animais estão descritos na Tabela 1. No M0 nenhuma alteração de locomoção foi verificada em ambos os grupos. No M7 observou-se no GSS escore três em 91,66% dos animais e escore dois em 8,34%. No GCM todos os animais (100%) obtiveram escore três em M7. No M15 em ambos os grupos 100% dos animais obtiveram escore três. No M30 do GSS um animal apresentou escore dois (8,34%) e os outros animais obtiveram escore três (91,66%), já no GCM todos os animais obtiveram escore três exceto o animal 1025 que se recusou a andar. No M45 o GSS apresentou dois animais com escore dois (16,6%) e os outros com escore três (83,4%) sendo que dois animais também se recusaram a andar. Já no GCM apenas um animal (8,34%) obteve escore dois e os demais escore três. Por fim, no M60 encontrou-se escore dois em um animal (8,34%) e escore três em nove animais (91,66%) no GSS sendo que um animal novamente se recusou a andar. No GCM todos os animais (100%) obtiveram escore três.

O déficit de flexão no membro direito encontrado na avaliação da marcha foi sutil a ponto de precisar reduzir a velocidade de execução do filme para que fosse observada tal alteração. Já nos animais que possuíam a pododermatite essa alteração já foi mais acentuada. Na análise estatística observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente entre o M0 e o M7, M15, M30, M45 e M60, mas não entre os grupos.

Na avaliação da área de impressão de apoio dos membros sobre o papel, obtiveram-se os valores médios que estão apresentados na Tabela 2. No GCM o membro operado apresentou uma média da área de apoio de  $14,70 \text{ cm}^2$  e um desvio padrão de 1,21 enquanto que no GSS observou-se uma área de  $15,75 \text{ cm}^2$  e um desvio padrão de 1,81. Na análise estatística não foi observada diferença significativa entre os grupos nos diferentes momentos, nem dentro do grupo entre os momentos. Também não foram observadas diferenças significativas entre o membro operado e o membro normal dos coelhos.

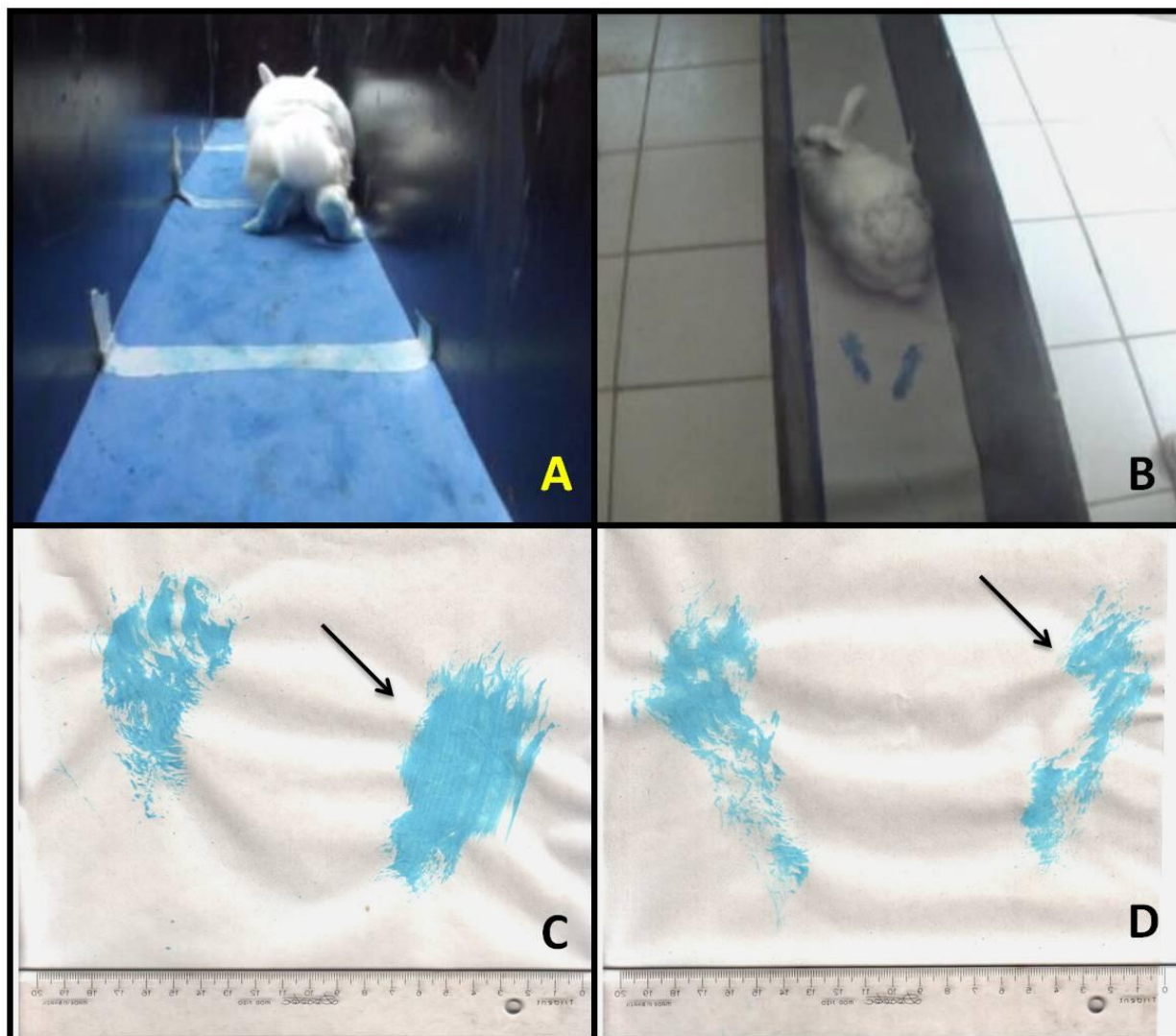


FIGURA 2 - Avaliação da locomoção e das pegadas de coelhos após indução de lesão do nervo tibial e reparação por meio da técnica de tubulização e tratados (Grupo Célula Mononuclear – GCM) ou não (Grupo Solução Salina – GSS) com células mononucleares de medula óssea. A) corredor onde foram capturadas as imagens de vídeo para posterior análise da marcha; B) teste de avaliação da área de impressão de apoio dos membros pélvicos; C) e D) impressões das pegadas dos coelhos. Nota-se que a impressão da pegada do membro operado do GSS (seta da figura C) foi maior que no membro operado do GCM (seta da figura D) após sete dias do procedimento cirúrgico realizado no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG de julho-outubro de 2010.

TABELA 1 - Escores da marcha de coelhos submetidos à lesão no nervo tibial com reparação por meio da técnica de tubulização tratados com células mononucleares de medula óssea (GCM) ou com solução de Cloreto de sódio a 0,9% (GSS), antes do procedimento cirúrgico (M0) e aos sete (M7), 15(M15), 30(M30), 45(M45) e 60(M60) dias após o procedimento cirúrgico realizado no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG de julho-outubro de 2010.

Grupos	Animal	M0	M7	M15	M30	M45	M60
Solução salina	1002	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1003	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1004	0 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1005	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1006	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	-
	1007	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1008	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	-	3 <sup>b</sup>
	1009	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	-	2 <sup>b</sup>
	1010	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1012	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1013	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1026	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
Células Mononucleares	1014	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1015	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1016	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1017	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1018	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1019	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1020	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1021	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1022	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
	1023	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>
1024	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	
1025	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	-	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	

0 – passos sem déficit de flexão; 2 – três a quatro passos com déficit de flexão; 3 – cinco a seis passos com déficit de flexão.

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Mann-Whitney para  $p < 0,05$ .

TABELA 2 - Valores, média e desvio padrão (DP) em cm<sup>2</sup> da área das impressões das pegadas de coelhos após lesão no nervo tibial submetidos a técnica de tubulização tratados (GCM) ou não (GSS) com células mononucleares autólogas de medula óssea em estudo realizado na Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG de julho-outubro de 2010

Momentos	GCM		GSS	
	ESQ	DIR	ESQ	DIR
M0	13,76 <sup>a</sup>	14,3 <sup>a</sup>	14,7 <sup>a</sup>	15,26 <sup>a</sup>
M7	13,16 <sup>a</sup>	13,03 <sup>a</sup>	14,36 <sup>a</sup>	12,44 <sup>a</sup>
M15	14,48 <sup>a</sup>	16,12 <sup>a</sup>	15,56 <sup>a</sup>	17,68 <sup>a</sup>
M30	15,15 <sup>a</sup>	16,13 <sup>a</sup>	15,32 <sup>a</sup>	16,26 <sup>a</sup>
M45	14,95 <sup>a</sup>	14,6 <sup>a</sup>	18,21 <sup>a</sup>	16,86 <sup>a</sup>
M60	14,28 <sup>a</sup>	14,07 <sup>a</sup>	17,69 <sup>a</sup>	15,85 <sup>a</sup>
MÉDIA	14,29667	14,70833	15,97333	15,725
DP	0,744168	1,217923	1,59822	1,812156

Letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Análise de Variância em parcelas subdivididas  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

A escolha do coelho como modelo experimental permitiu reduzir complicações referentes à manipulação e os custos com a manutenção dos animais. Além disso, a facilidade do acesso cirúrgico e a espessura do nervo tibial facilitaram a utilização de fios de sutura e do tubo de silicone de maior calibre em comparação aos utilizados em ratos. COLOMÉ et al., (2008) e TRINDADE (2009) relataram em seus estudos as mesmas observações quanto ao custo do experimento e facilidade de manipulação desta espécie animal.

Em relação à colheita da medula óssea, não foram observadas intercorrências como alterações de locomoção no membro torácico, hematomas na região da punção e infecções ósseas após o procedimento. EURIDES et al. (2010), OLIVEIRA (2009), SOUZA (2009) e IM et al. (2001) também não observaram qualquer tipo de alteração no local da punção. Além disso, neste

trabalho, a técnica de punção no tubérculo umeral, pela flexão da articulação escápulo-umeral, permitiu a exata localização do ponto de punção, facilitando a introdução da agulha na cortical óssea como também conseguido por EURIDES et al. (2010).

O rendimento médio das células mononucleares deste estudo foi superior ao de outros trabalhos demonstrando que o tubérculo umeral pode ser o local mais adequado para a obtenção de aspirados de medula óssea em coelhos, pois permitiu obter quantidade superior de células quando comparados a outros locais. YANAI et al. (2005) obtiveram uma média de  $5 \times 10^6$  células/ml enquanto que IM et al. (2001) obtiveram somente  $3,4 \times 10^6$  células/ml isoladas da medula óssea do fêmur e da tíbia de coelhos, respectivamente, confirmando a superioridade do rendimento das células deste estudo. A quantidade de células inoculadas foi de  $2 \times 10^6$  por se tratar de uma quantidade suficiente para promover reparação tecidual e melhoria dos processos regenerativos conforme descrito por SUTER et al. (2004).

A pododermatite ulcerativa observada durante o experimento pode ter ocorrido por excesso de pressão aplicada sobre o local acometido. Em condições normais, sabe-se que o coelho, em repouso, sustenta grande parte de seu peso sobre a região do calcâneo, tarso e metatarso (HARCOURT-BROWN, 2002). Desse modo, o excesso de fricção da região à grade da gaiola em decorrência do comprometimento motor do nervo tibial, junto com a perda da função sensitiva nessa região (GUTMANN & GUTMANN, 1942), podem ter favorecido o aparecimento e a evolução das lesões. As lesões associadas aos membros operados não se resumiram apenas à derme. Em muitos animais o processo inflamatório se estendeu até a articulação tíbiotársicametatársica, o que causava conseqüentemente dor à locomoção. Segundo HARCOURT-BROWN (2002), coelhos com artrite tendem a se manter imóveis ou poupar o membro lesionado, o que poderia explicar a observação de alterações mais acentuadas de marcha nesses animais.

A metodologia de avaliação clínica da marcha foi baseada nos estudos de BELOOZEROVA et al. (2003) que utilizaram uma caixa de 2,5m de comprimento e 50cm de largura para observar a locomoção de coelhos e, conseqüentemente, analisar a atividade de seus neurônios motores. No entanto, a

lesão no nervo tibial não causou alterações consistentes de locomoção como foi observado também por TRINDADE (2009). Tal fato explica a dificuldade encontrada neste estudo para a avaliação da marcha dos coelhos. Mesmo assim, apesar de sutil, encontrou-se um déficit de flexão que provavelmente se deveu ao fato do nervo tibial inervar músculos flexores, essenciais para a adequada movimentação da região plantar do coelho para realizar saltitamentos, o que define o seu padrão típico de locomoção conforme TRINDADE (2009).

A diferença significativa entre o M0 e os demais momentos na avaliação da marcha, já era um resultado esperado, uma vez que no M0, os animais ainda não haviam sido submetidos à lesão no nervo tibial e a locomoção desenvolvia-se normalmente. Já do M7 até o M60, a ausência de diferença significativa permitiu inferir que não houve evolução do processo de reparação nervosa a ponto de restabelecer a função motora e, portanto, o padrão de locomoção característico da espécie não foi observado. DOURADO (2002) e EVANS (2000) afirmaram que apesar dos considerados avanços tecnológicos na reparação de nervos periféricos, a reabilitação de funções sensoriais e motoras continua sendo um desafio para os pesquisadores e que, mesmo havendo regeneração tecidual, o retorno às funções do nervo lesado é raramente alcançado.

A utilização da planimetria, mesmo não havendo descrição na literatura da aplicação deste teste em coelhos, justificou-se pelo fato de ser um animal que se movimenta em saltos, e o peso concentrar-se nos membros pélvicos no momento da locomoção, deixando um registro marcante no papel sobre o solo (Figura 2C e D) conforme HARCOURT-BROWN (2002). No entanto, o peso do coelho, os pêlos, a quantidade de tinta na pata e a diluição da tinta em água podem interferir no resultado. Assim, caso novos estudos consigam padronizar estas variáveis, a planimetria pode se tornar uma importante ferramenta para a avaliação da evolução clínica de coelhos com lesão no nervo tibial.

## CONCLUSÃO

Nas condições em que foi conduzido este experimento, os coelhos que foram submetidos à neurectomia do nervo tibial e tratados com células-tronco autólogas da medula óssea não apresentaram melhores resultados clínicos quanto à recuperação funcional motora em comparação àqueles tratados com solução salina. Além disso, a planimetria mostrou-se ser um teste inviável para este tipo de avaliação em coelhos.

## REFERÊNCIAS

1. BELOOZEROVA, I.; SIROTA, M. G.; SWADLOW, H. A. Activity of Different Classes of Neurons of the Motor Cortex during Locomotion. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 23, n. 3, p. 1087-1097, 2003.
2. COLOMÉ, L.M.; GOMES, C.; CROSIGNAN, N.; PAZ, A.H.; LUGO, A.A.; GUIMARÃES, K.M.; FOERSTROW, L.P.; TESSARI, J. P.; COLOMÉ, L. M.; GRAÇA, D.L.; MEURER, L.; PASSOS, E.P.; PIPPI, N. L.; CONTESINI, E.A.; LIMA, E. O.C. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, p.2529-2534, 2008.
3. COSTA, L. M.; SIMÕES, M. J.; MAURICIO, A. C.; VAREJÃO, A. S. P. Methods and Protocols in Peripheral Nerve Regeneration Experimental Research: Part IV—Kinematic Gait Analysis to Quantify Peripheral Nerve Regeneration in the rat. **International Review of Neurobiology**, New York, v.87, p.127-139, 2009.
4. DeMEDINACELI, I.; FREED, W. J; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, New York, v.77, p.634-643, 1982.
5. DOURADO, E. **Reparación Microquirúrgica Del nervio facial de conejo. Estudio comparativo de la sutura epineural y el sistema adhesivo de fibrina**. 2002. 255f. Tese (Doutorado) Universidade de Barcelona, Barcelona.
6. EURIDES, D. OLIVEIRA, B. J. N. A.; SOUZA, L. A.; SILVA, L. A. F.; DALECK, C. R.; FREITAS, P. M. C. Obtenção de células mononucleares da medula óssea pela punção do tubérculo umeral de coelhos. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.71-76, 2010.
7. EVANS, G. R. D. **Challenges to nerve regeneration. Seminars in Surgical Oncology**. New York, n. 19, p. 312–318, 2000.

8. GUTMANN, E.; GUTMANN, L. Factors affecting recovery of sensory function after nerve lesions. **Journal Neurology Psychiatry**, London, n.5, p.117-129, 1942.
9. HARCOURT-BROWN, F. Skin diseases. In: HARCOURT-BROWN, F. **Textbook of Rabbit Medicine**. Oxford: British Library, 2002. Cap.9, p. 224-248.
10. IM, G. I.; KIM, D. Y., SHIN, J. H., HYUN, C. W., CHO, W. H. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v.83, n.2, p.289-294, 2001.
11. NAVARRO, X.; UDINA, E. Methods and Protocols in Peripheral Nerve Regeneration Experimental Research: Part III—Electrophysiological Evaluation. **Internacional Review of Neurobiology**, New York, v.87, p.105-126, 2009.
12. NEIVA, P. Células que salvam vidas. Disponível em: Veja online, Ed. 1932, acessado em 10/01/2011. <http://veja.abril.com.br/231105/p-118.html>.
13. OLIVEIRA, B. J. N. A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
14. SKARDA, R. T; TRANQUILI, W. J. Local and regional anesthetic and analgesic techniques: cats. In: TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K.A. **Lumb & Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia**, 4.ed. Philadelphia: Blacwell, 2007. Cap. 21, p.595-604.
15. SOUZA, L. A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos**. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
16. SUTER, S. E., GOUTHRO, T. A., MCSWEENEY, P. A., NASH, R. A., HASKINS, M. E., FELSBURG, P. J., HENTHORN, P. S. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34+ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.101, n.1-2, p.31-47, 2004.
17. TRINDADE, A. B. **Terapia celular na regeneração e recuperação funcional do defeito agudo do nervo femoral em coelhos Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*)**. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
18. YANAI, T., ISHII, T., CHANG, F., OCHIAI, N. Repair of large full-thickness articular cartilage defects in the rabbit. The effects of joint distraction and autologous bone marrow- derived mesenchymal cell transplantation. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v.87, n.5, p.721-729, 2005.

19. ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, 23 p.

### **CAPÍTULO 3 - CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA EM ASSOCIAÇÃO À TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO NA REGENERAÇÃO DO NERVO TIBIAL DE COELHOS: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA**

#### **RESUMO**

As células mononucleares obtidas da medula óssea podem atuar na regeneração nervosa se tornando uma alternativa para reparação que acometem os nervos periféricos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi verificar se as células mononucleares autólogas de medula óssea associada à técnica de tubulização auxiliam na regeneração do nervo tibial de coelhos. As células mononucleares foram retiradas da medula óssea por meio da punção no tubérculo umeral e purificadas para serem inoculadas ( $2 \times 10^6$  células em 0,1ml de solução) em um grupo de 12 animais (Grupo Célula Mononuclear – GCM) no interior de um tubo de silicone utilizado para a união das extremidades do nervo tibial do membro pélvico direito seccionado cirurgicamente. Em outros 12 coelhos foram inoculados 0,1mL de solução salina (solução de cloreto de sódio 0,9%) em substituição às células mononucleares, sendo o grupo denominado Grupo Solução Salina (GSS). Após 60 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à eutanásia e as amostras do nervo analisados por microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão. Na microscopia óptica foram avaliadas a presença e intensidade de infiltrado inflamatório, grânulos de hemossiderina, granulomas, vasos sanguíneos, densidade celular e colágeno. Na microscopia eletrônica foram realizadas análises descritivas do núcleo das células de Schwann e a conformação da bainha de mielina. Além disso, foi realizada análise morfométrica dos elementos celulares empregando o programa *Image J*. Os resultados sugeriram que as células mononucleares autólogas de medula óssea não trouxeram benefícios no crescimento das células nervosas, porém, estas células podem ter se diferenciado nos tecidos de sustentação do nervo periférico.

**Palavras-chave:** células-tronco; tubo de silicone, reparação nervosa.

## CHAPTER 3 – AUTOLOGOUS MONONUCLEAR BONE MARROW CELLS IN ASSOCIATION WITH TUBULIZATION TECHNIQUE IN THE REGENERATION OF TIBIAL NERVE OF RABBITS: MORPHOMETRY AND HISTOLOGY EVALUATION

### ABSTRACT

The mononuclear cells obtained from bone marrow can act on nerve regeneration becoming an alternative to repairing that affects the peripheral nerves. Therefore, the objective of this study was to determine whether autologous mononuclear bone marrow tubing associated with technical helps in the regeneration of rabbit tibial nerve. The mononuclear cells were taken by bone marrow puncture through the humeral tubercle and purified to be inoculated ( $2 \times 10^6$  cells in 0.1 ml of solution) in a group of 12 animals (Mononuclear Cell Group - MCG) in a silicon tube used for the union of the tibial nerve ends right pelvic limb surgically severed. In another 12 rabbits 0.1 mL of saline solution (sodium chloride 0,9%) were inoculated to replace the mononuclear cells. The group was called Saline Group (SSG). Sixty days after surgery, the animals were euthanized and nerve samples were analyzed by optical microscopy and transmission electron microscopy. The presence and intensity of inflammatory infiltrate, hemosiderin granules, granulomas, blood vessels, cell density and collagen were evaluated by light microscopy. Descriptive analysis of the Schwann cells nucleus and the formation of the myelin sheath were performed by means of electron microscopy. In addition, morphometric analysis of cellular elements employing the program Image J was carried out. The results suggested that the autologous mononuclear bone marrow cells did not bring benefits to the growth of nerve cells; however, these cells may have been differentiated in the tissues that support the peripheral nerve.

**Keywords:** nervous repair, silicone tube, stem cells

### INTRODUÇÃO

O grande interesse pela utilização terapêutica das células-tronco vem aumentando com a expansão do conhecimento acerca dessas células e a possibilidade de que possam diferenciar-se em células dos mais diversos tecidos como, por exemplo, as do sistema nervoso (VENTURIM, 2008). Com a utilização de células-tronco adultas, o interesse aumenta ainda mais, pois se tratam de células que não fazem parte da discussão ética relacionada com as células-tronco de origem embrionária (COLOMÉ, 2007).

Uma importante fonte de células-tronco são as células mononucleares da medula óssea (CMMO). Essas células podem atuar na regeneração nervosa de diversas maneiras. Estudos mostram a utilização das CMMO na indução e proliferação das células de Schwann (KEILHOFF et al., 2006), na regulação e expressão de fatores tróficos responsáveis pela regeneração nervosa (CHEN et al., 2007; WANG et al., 2009) e no aumento da velocidade de regeneração de nervos periféricos (COLOMÉ et al., 2008), mas para que as CMMO possam agir é necessário que haja um microambiente propício para sua atuação.

A utilização de tubos artificiais, em lesões nas quais não haja a possibilidade de união dos cotos nervosos, é uma alternativa, pois consegue atender às necessidades para a ocorrência de uma boa regeneração nervosa, promovendo no interior do tubo um ambiente que gera uma maior concentração de fatores tróficos, redução da invasão de outros tipos celulares e auxílio na orientação no crescimento axonal evitando formação de neuroma ou excessiva ramificação nervosa (CHEN et al., 2007).

Além de um microambiente favorável, o sucesso no processo regenerativo dos nervos depende de uma sequência de respostas celulares que devem estar associadas (MAKWANA & RAIVICH, 2005), como por exemplo, proliferação das células de Schwann para mielinização das fibras nervosas e a síntese de fatores de crescimento no segmento distal do nervo. Concomitantemente, uma ponte constituída de fibrina conecta os cotos nervosos, sendo formados por células não neurais, vasos sanguíneos e componentes da Matriz Extra Celular (MEC). Dentre os componentes da MEC, o colágeno é de fundamental importância para que os brotamentos axonais atinjam o órgão-alvo, reinervando-o (PIERUCCI, 2004).

Para avaliação do processo de regeneração dos nervos periféricos se devem levar em consideração os aspectos macroscópicos e microscópicos do nervo regenerado. Assim, os estudos para estes fins utilizam técnicas histológicas e morfométricas empregando diferentes técnicas de colorações de modo a auxiliar na avaliação (CRISCI, 2001). O presente estudo teve como objetivo a utilização da histologia e da morfometria para avaliação dos efeitos das células mononucleares autólogas de medula óssea associadas à técnica de tubulização nervosa, na regeneração do nervo tibial em coelhos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no período de julho a agosto de 2010 na Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, protocolo nº10/2009. Foram utilizados 24 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia albinos, machos e fêmeas, pesando em média 3,0kg. Os animais foram mantidos durante o período experimental em gaiolas individuais específicas, em ambiente com temperatura controlada, recebendo alimentação à base de ração comercial (Ração do Sítio Coelho<sup>®</sup> - Guabi Nutrição Animal, Anápolis – Go) e água *ad libitum*.

Para a colheita e processamento da medula óssea uma agulha hipodérmica 25x8 previamente heparinizada foi inserida na região do tubérculo maior do úmero após flexão da articulação escápulo-umeral. Em seguida foi acoplada à agulha uma seringa de 10 ml previamente heparinizada e realizou-se punção da medula óssea íntegra. Para a realização desse procedimento, os animais foram submetidos à anestesia injetável com uma associação de 1,0mg/kg de sulfato de morfina (Dimorf<sup>®</sup>, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira/SP), 1,0mg/kg de cloridrato de xilazina (Calmiun<sup>®</sup>, Agener União, São Paulo/SP); 2,0mg/kg de cloridrato de midazolam (Midazolam<sup>®</sup>, União Química, Jabaquara/SP) e 30mg/kg de cloridrato de cetamina (Ketamina<sup>®</sup>, Agener União, São Paulo/SP), por via intramuscular. Após o decúbito lateral, procedeu-se a canulação da veia auricular lateral com cateter 24G. Os animais foram mantidos durante todo o período em máscara facial com oxigênio em um volume corrente de 2L/min. As frações da medula foram então encaminhadas ao Laboratório de Genética e Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas da UFG para isolamento, determinação do rendimento e viabilidade das células mononucleares conforme protocolo descrito por OLIVEIRA (2009) e SOUZA (2009).

Posteriormente ao processamento da medula óssea os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico utilizando, além do protocolo anestésico da colheita de medula óssea, uma anestesia epidural entre a última vértebra lombar

e a primeira vértebra sacral, empregando uma associação de 5,0mg/kg de cloridrato de lidocaína sem vasoconstritor a 2% (Anestésico L<sup>®</sup>, Pearson, Eurofarma, São Paulo/SP) e 0,6mg/kg de cloridrato de bupivacaína sem vasoconstritor a 0,5% (Neocaína<sup>®</sup>, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira/SP) tomando o cuidado para não ultrapassar o volume de 0,25mL/kg, como descrito rotineiramente para outras espécies domésticas (SKARDA & TRANQUILI, 2007). Em seguida procedeu-se a tricotomia na face lateral do membro pélvico direito. Com o animal posicionado em decúbito lateral, foi realizada antissepsia de pele com a aplicação seqüencial de álcool, iodopovidona e álcool e, realizado o acesso cirúrgico pela face lateral da coxa. Após localizar a porção tibial do nervo ciático criou-se um defeito nervoso, por secção completa do nervo, no terço médio de seu comprimento exposto pela ferida cirúrgica. Posteriormente, as extremidades de um tubo oco de silicone (Medicone<sup>®</sup>, Fibra Cirúrgica, Cachoeirinha – RS) de 1,5mm de diâmetro interno e 2,42mm de diâmetro externo com 15mm de comprimento foram fixadas à camada epineural das extremidades dos cotos do nervo utilizando fio monofilamentar de náilon calibre 6-0 (Technofio<sup>®</sup>, Ace Indústria e Comércio, Goiânia, GO, Brasil) em padrão interrompido simples.

No espaço entre os cotos do nervo tibial delimitado pelo lúmen do tubo de silicone, foi injetada a fração de células mononucleares autólogas de medula óssea em um volume de 0,1ml em um grupo de 12 coelhos, sendo denominados de Grupo Células Mononucleares (GCM). Nos outros 12 animais foi injetado o mesmo volume de solução de cloreto de sódio a 0,9%, sendo denominada de Grupo Solução Salina (GSS). No pós-operatório foi administrado antibiótico a base de cefazolina sódica, 30 mg/kg, por via IM, de 12/12 horas durante sete dias. Para analgesia, foi utilizado o cloridrato de tramadol (Cloridrato de Tramadol<sup>®</sup>, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Pouso Alegre/MG), 2,0 mg/kg, via SC, de 12 em 12 horas, durante os três primeiros dias. Os curativos da ferida cirúrgica foram realizados uma vez ao dia, com gazes umedecidas em solução de cloreto de sódio a 0,9%, por 10 dias. Durante o período pós-operatório os coelhos foram mantidos com colar elizabetano.

Os animais foram observados por um período de 60 dias e em seguida foram submetidos à eutanásia utilizando sobredose de tiopental sódico

(Thiopentax<sup>®</sup>, Cristália, Belo Horizonte/MG) e cloreto de potássio (Cloreto de Potássio<sup>®</sup>, Equiplex, Aparecida de Goiânia/GO) intravenoso, para posterior avaliação macroscópica, histológica e morfométrica.

Para avaliação histológica colheram-se as amostras dos nervos tibiais presentes no interior do tubo de silicone abrangendo também a região de transição entre a parte regenerada e a parte normal. Dos 12 segmentos de nervos tibiais de cada grupo oito segmentos foram incluídos em solução de Karnovsky (solução aquosa de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5%), sendo que quatro amostras foram submetidas à microscopia eletrônica e quatro à coloração de Azul de Toluidina 0,25%. Os outros quatro segmentos de cada grupo foram incluídos em formol tamponado a 10%. Para a microscopia eletrônica de transmissão como a amostra deveria ser de no máximo 3mm, pôde-se aproveitar o restante do material para fixação em formalina tamponada a 10% passando-se a ter portanto oito amostras para realização da coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

As amostras utilizadas para HE foram pós-fixadas em álcool 70%, incluídas em parafina e clivadas com cinco micrômetros de espessura. Realizaram-se cortes longitudinais que foram avaliados de acordo com: presença de infiltrado inflamatório, grânulos de hemossiderina, presença de granulomas, vasos sanguíneos, colágeno e densidade celular. Para tanto, desenvolveram-se escores detalhados no Quadro 1.

As amostras coradas com Azul de Toluidina 0,25%, após fixação de 24 horas na solução de Karnovsky, foram mantidas em tampão de cacodilato de sódio 0,2M. No processamento as amostras foram retiradas do tampão, incluídas em historesina (Leica Historesin Embedding Kit<sup>®</sup>, Aotec Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo/SP) e clivadas em cortes de quatro micrômetros de espessura com navalha de vidro. Essas amostras foram coradas e analisadas descritivamente quanto ao direcionamento das fibras nervosas em microscópio óptico de luz comum.

QUADRO 1 - Metodologia de avaliação das alterações encontradas nos cortes histológicos corados com HE do nervo tibial de coelhos tratados com células mononucleares autólogas de medula óssea (GCM) ou não tratados (GSS), após lesão e correção cirúrgica por meio da técnica de tubulização, realizada na Escola de Veterinária e Zootecnia/UFG, no período de julho a outubro de 2010.

Variáveis	Metodologia	
Granulomas	Número absoluto por contagem de toda a área regenerada em	
Vasos sanguíneos	campo de magnificação de 400x. 10 campos/lâmina.	
Hemossiderina		
Infiltrado inflamatório	Estimativa (%) da área de ocupação em campo de magnificação de 400x	<b>Escore</b> Discreto (até 30%)
Densidade celular		Moderado (30 a 70%)
Colágeno		Intenso (> 70%)

As amostras para microscopia eletrônica de transmissão também foram mantidas em cacodilato de sódio 0,2M. No processamento foram pós-fixadas em solução de Tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 0,4% por uma hora e 30 minutos respectivamente. Após desidratação em série crescente de acetona (50%, 70%, 80%, 90%, 95% por cinco minutos cada e 100% três vezes de 10 minutos cada) foram incluídas em resina Epon e clivadas, em ultramicrótomo, com lâmina de diamante, na espessura de 60nm. Posteriormente, os cortes foram contrastados com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo a 10% por 10 minutos cada e analisados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss Electron Microscope, Modelo EM 109). Foram mensuradas a espessura da bainha de mielina e a área dos axônios mielínicos. Para isso utilizou-se um programa de imagem denominado de *ImageJ* (National Institutes of Health, United States of America, <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Além disso, avaliou-se descritivamente o núcleo das células de Schwann e a conformação da bainha de mielina.

Após tabulação dos dados, realizou-se a análise estatística empregando o programa BioEstat (versão 5.0, Belém-PA, Brasil) aplicando o teste de Man-Whitney para as variáveis densidade celular, colágeno e infiltrado inflamatório e teste t de Student para a avaliação morfométrica. Para as variáveis neovascularização, hemossiderina e granuloma foi realizada análise descritiva. O nível de significância foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

O procedimento cirúrgico foi realizado sem intercorrências em todos os animais e a técnica de tubulização foi considerada de fácil exequibilidade. Macroscopicamente houve a união dos cotos nervosos no interior do tubo em todos os animais de ambos os grupos e não foi visualizada invasão de tecido adjacente para o interior do tubo (Figura 1A). A parte regenerada apresentava um aspecto cilíndrico, esbranquiçado semelhante ao nervo normal (Figura 1B).

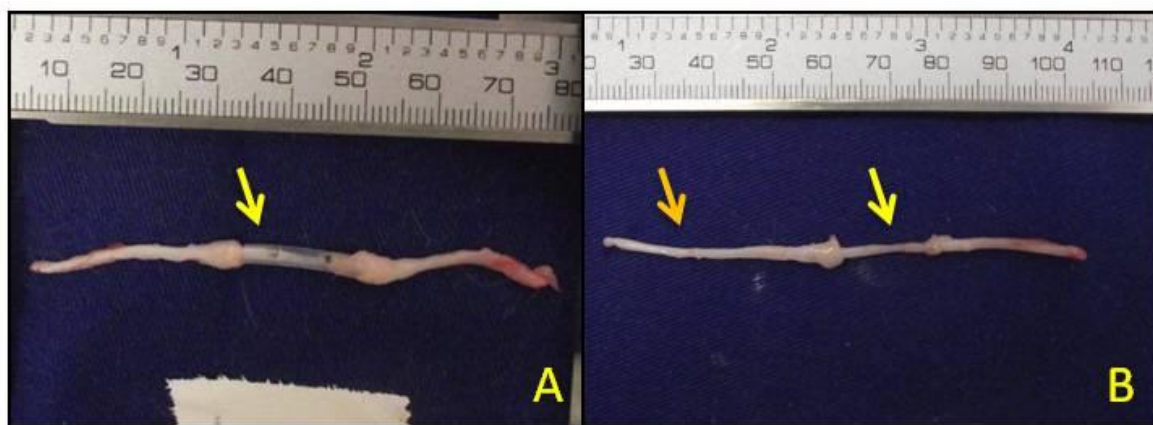


FIGURA 1 - Aspecto macroscópico do nervo tibial de coelho após 60 dias da neurectomia cirúrgica. A) Nervo tibial no interior do tubo de silicone de um animal do GSS em que pode ser notado que não houve invasão de tecido adjacente para o interior do tubo. B) nervo tibial, após retirada do tubo, de um animal do GCM. Observa-se que a parte regenerada (seta amarela), apesar de mais estreita, possui o mesmo aspecto macroscópico que o nervo normal (seta laranjada).

Nas variáveis que receberam análise estatística, não houve diferença significativa entre os grupos. O infiltrado inflamatório, composto de linfócitos e heterófilos, foi considerado discreto em três (42,85%) animais do GSS enquanto que no GCM não foi encontrado infiltrado inflamatório. O colágeno foi considerado discreto em um (14,28%) animal, moderado em quatro (57,14%) e intenso em dois (28,57%) animais do GSS. Já no GCM encontrou-se apenas um (14,28%) animal com presença discreta de colágeno e os outros seis (85,71%) animais foram considerados intensos. Para a densidade celular o GCM também apresentou um (14,28%) animal com presença discreta e os outros seis (57,14%) animais foram

considerados intensos. Porém para o GSS um (14,28%) animal foi considerado discreto, em três (42,85%) animais foi moderado e nos outros três (42,85%) intenso. No parâmetro hemossiderina foi encontrado um grânulo no GSS e nenhum no GCM. Já o granuloma verificou-se apenas um no GCM enquanto que no GSS não foi verificada presença de granulomas. Em relação à neovascularização, no GSS, foi contabilizada uma média de 26,14 vasos sanguíneos, de diferentes calibres, por animal na área regenerada, enquanto que no GCM esse número caiu para 9,04 vasos por animal. Na Figura 2 estão demonstrados graficamente esses resultados. Nas amostras coradas com Azul de Toluidina 0,25% foram observadas fibras nervosas alinhadas em paralelo demonstrando padrão semelhante a de um nervo normal, em ambos os grupos, não sendo observada diferença entre eles (Figura 3).

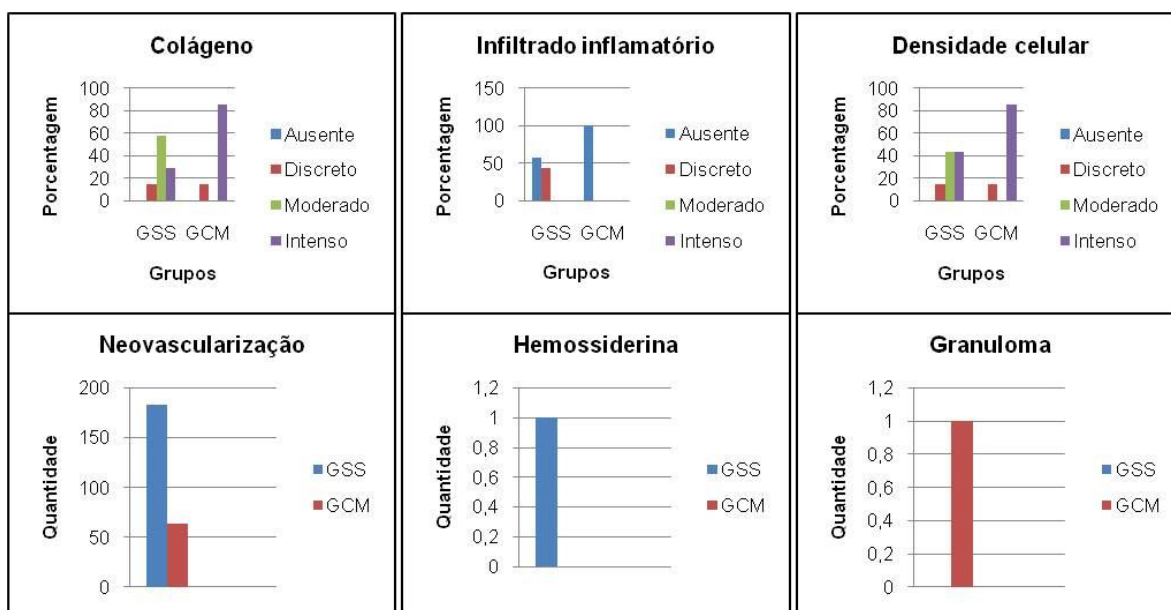


FIGURA 2 - Gráficos demonstrando os resultados da análise microscópica de amostras do nervo tibial de coelhos, corados com HE, tratados (GCM) ou não tratados (GSS) com células mononucleares autólogas de medula óssea, após lesão e correção cirúrgica por meio da técnica de tubulização realizada na Escola de Veterinária e Zootecnia/UFG, no período de julho a outubro de 2010.

Na análise histológica por meio de microscopia eletrônica de transmissão pode-se observar, em ambos os grupos, que a cromatina no núcleo das células de Schwann encontrava-se em grumos e descondensada e que existiam poros na membrana do núcleo. Observaram-se, também, bainhas de

mielina com fendas e com aspecto diferente do normal com áreas menos densa, se tornando mais esbranquiçadas e pouco delimitadas (Figura 3).

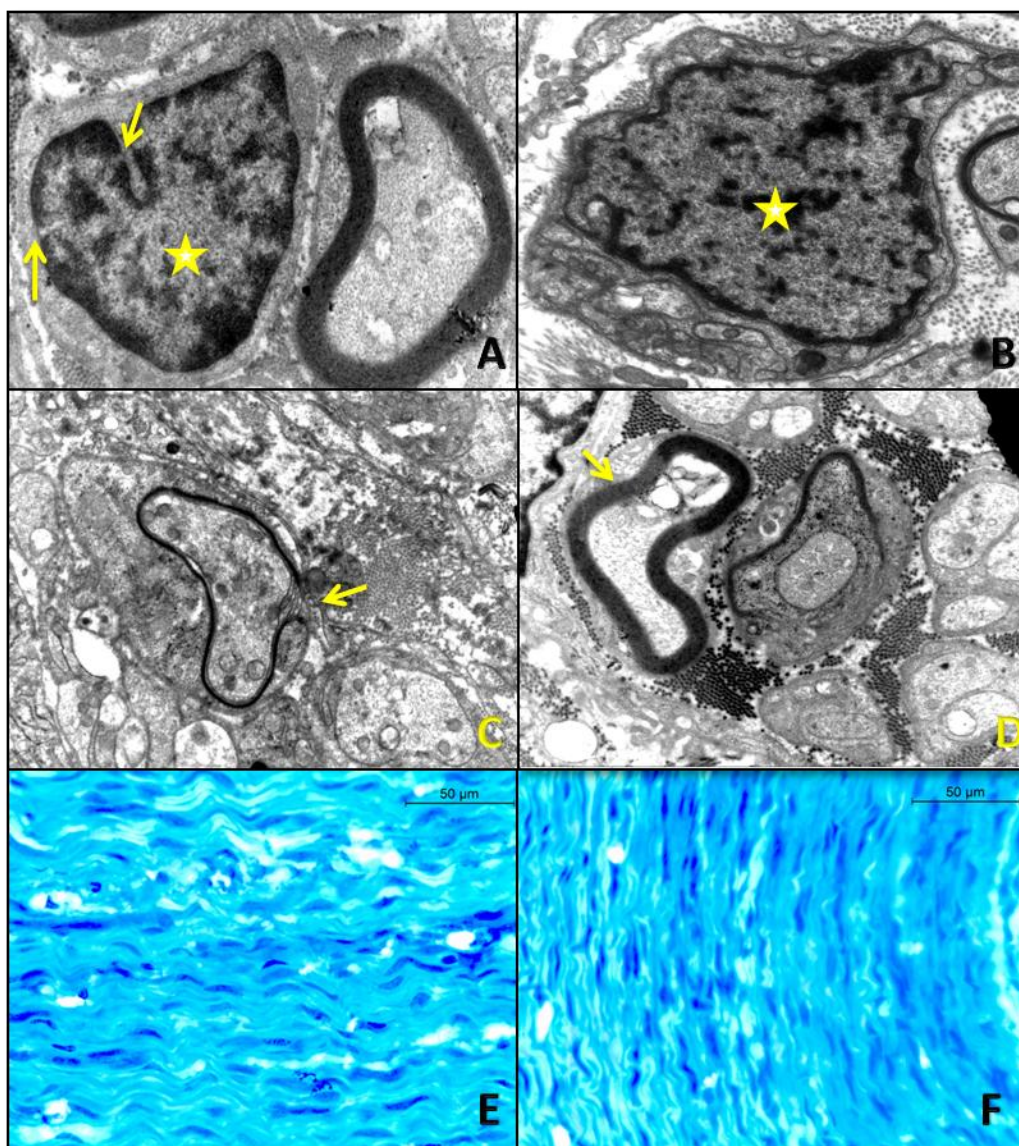


FIGURA 3 – Fotomicrografia eletrônica do nervo tibial de coelhos. A) Corte transversal do núcleo célula de Schwann demonstrando os poros na membrana nuclear (setas) e a cromatina descondensada e em grumos (estrela) em um animal do GSS (12000x). B) Núcleo da célula de Schwann demonstrando a cromatina em grumos e descondensada em um animal do GCM (12000x). C) Fenda encontrada na bainha de mielina (seta) de um axônio pertencente a um animal do GSS (12000x). D) Bainha de mielina com presença de baixa densidade demonstrada por um aspecto mais esbranquiçado (seta) (12000x). E) Orientação das fibras nervosas em corte longitudinal do GSS (400x); F) Fibras nervosas realinhadas do GCM (400x).

Na avaliação morfométrica, por meio de microscopia eletrônica, tanto a área dos axônios mielínicos quanto a espessura da bainha de mielina foi

significativamente superior no GSS comparado ao GCM. No GSS a média da área dos axônios foi de  $7,44 \mu\text{m}^2$  enquanto que no GCM foi de  $5,44 \mu\text{m}^2$ . A média da espessura da bainha de mielina no GSS foi de  $0,316 \mu\text{m}$  enquanto que no GCM foi de  $0,240 \mu\text{m}$ . Os valores das médias, desvio padrão e do p estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 - Média em micrômetros e desvio padrão da área dos axônios mielínicos e espessura da bainha de mielina de nervos tratados (GCM) ou não tratados (GSS) com células mononucleares autólogas de medula óssea após neurectomia cirúrgica em coelho e correção por meio da técnica de tubulização em estudo realizado na Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG no período de julho a outubro de 2010.

Parâmetro	Área dos axônios mielínicos		Espessura da bainha de mielina	
	GSS	GCM	GSS	GCM
<b>Média</b>	7,44	5,44	0,316	0,240
<b>Desvio Padrão</b>	2,18	2,00	0,040	0,052
<b>P</b>	0,0465		0,0017	

## DISCUSSÃO

O tubo de silicone demonstrou ser um bom guia de nervos pelo fato de impedir a introdução de tecido adjacente ou exteriorização do coto regenerado, favorecendo o processo de regeneração evitando a cicatrização. BURNETT & ZAGER (2004) descreveram que cicatrizes no tecido nervoso impedem a formação da ponte de regeneração e interferem no processo de maturação dos axônios. COSTA et al. (2006), em estudo utilizando tubo de ácido poliglicólico na regeneração do nervo ciático de ratos, também não observaram escape de fibras regeneradas para o exterior do tubo. Em relação ao aspecto do nervo regenerado o resultado encontrado neste estudo foi demonstrado também por DELISTOIANOV (2007) ao utilizar tubo de silicone na regeneração dos nervos ulnar e torácico de eqüinos observou no interior do tubo uma estrutura de aspecto esbranquiçado e cilíndrico com a mesma coloração do nervo.

Na avaliação microscópica, a presença de um grânulo contendo hemossiderina no GSS significa hemorragia, justificada possivelmente por ação iatrogênica no momento do procedimento cirúrgico. COLOMÉ et al. (2008) também relataram a presença de grânulos de hemossiderina em suas amostras de

nervo tibial de coelhos e afirmaram ser um pigmento indicativo de degradação sanguínea.

O infiltrado inflamatório também observado no GSS apresentou características semelhantes ao observado por COLOMÉ et al., (2008) que relataram a presença de infiltrado inflamatório apenas no grupo que não recebeu células mononucleares no tratamento. Os autores associaram o achado ao fato de que a terapia celular aumenta a velocidade da resolução da resposta imune facilitando a remoção de fragmentos mielínicos e axonais. Assim a ausência de infiltrado inflamatório no GCM pode estar ligada à maior velocidade de resolução deste processo.

A presença de um granuloma em apenas um animal do GCM ocorreu possivelmente devido à presença de fio de sutura no perineuro. Isso demonstra que a técnica utilizada para neurografia evitou a ocorrência de reação do nervo ao fio de sutura. TORRES et al. (2003) afirmaram que o emprego das suturas epineurais e perineurais tem sido questionado devido à maior possibilidade de danificar o tecido neural com o material de sutura, resultando na formação de granulomas.

A celularidade observada no estudo possivelmente é composta por fibroblasto e células de Schwann, porém a coloração utilizada não permite diferenciá-los. Todavia, ao analisarmos a densidade celular e o colágeno paradoxalmente pode-se sugerir que o GCM esteja em uma fase mais avançada de regeneração que o GSS, pois segundo os estudos de LABRADOR et al. (1998) e CEBALLOS et al. (1999), a regeneração dos nervos periféricos depende da formação inicial da matriz de fibrina interligando os cotos nervosos de modo a disponibilizar uma superfície para o crescimento de fibroblastos, células endoteliais e de Schwann que migram dos cotos nervosos proximais e distais. Posteriormente, a fibrina então é lisada e substituída por fibrilas de colágeno orientadas longitudinalmente, demonstrando a importância da participação do colágeno, dos fibroblastos e das células de Schwann na regeneração tecidual nervosa.

Em relação à neovascularização verificada neste estudo, os resultados diferiram em relação aos parâmetros observados anteriormente. A maior concentração de vasos no GSS pode-se inferir que os animais deste grupo

estejam em um período mais avançado de regeneração nervosa. PODHAJSKY & MYERS (1993) ao analisarem a resposta vascular após lesão em nervo concluíram que na fase mais avançada da regeneração nervosa a quantidade de vasos sanguíneos aumentou e associou esses achados com o aumento da proliferação celular, alongamento neural e mielinização das estruturas nervosas.

Na microscopia eletrônica de transmissão, o aspecto nuclear das células de Schwann sugere um processo regenerativo ativo em ambos os grupos. CRISCI (2001) afirmou que o núcleo das células de Schwann apresenta características altamente indicativas de atividade regenerativa como, poros na membrana do núcleo, grumos de cromatina juntos a membrana e cromatina descondensada do restante da área do núcleo, que foram observados neste estudo.

No entanto, ao analisar os resultados da histomorfometria, observaram-se dados que diferem, em partes, aos da histologia. O fato da área dos axônios terem sido significativamente maior e a espessura da bainha de mielina significativamente mais espessa no GSS demonstraram que a regeneração está mais desenvolvida nos animais pertencentes ao GSS, pois segundo AKASSOGLU et al. (2003), para a reparação nervosa acontecer de maneira eficaz deve haver uma combinação do crescimento axonal e de remielinização pelas células de Schwann. Neste sentido, os resultados apresentados não permitem corroborar as conclusões de BRAGA-SILVA et al., (2006), que utilizaram a morfometria na avaliação da regeneração de nervo de ratos e apresentaram resultados favoráveis ao desenvolvimento da regeneração nervosa nos animais tratados com células tronco de medula óssea.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados encontrados neste estudo podem confirmar que as células mononucleares de medula óssea não trouxeram benefícios no crescimento de tecido nervoso. No entanto, o melhor desenvolvimento dos tecidos que formam a estrutura do nervo periférico nos mostra que as células

mononucleares podem ter se diferenciado nos tecidos de sustentação destes nervos trazendo, neste aspecto, benefícios para a regeneração nervosa.

## REFERÊNCIAS

1. AKASSOGLU, K.; AKPINAR, P.; MURRAY, S.; STRICKLAND, S. Fibrin is a regulator of Schwann cell migration after sciatic nerve injury in mice. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 338, n. 3, p. 185-188, 2003.
2. BRAGA-SILVA J.; GEHLEN, D.; ROMAN, J. A.; MENTA, C.; ATKINSON, E. A.; MACHADO, D. C.; VIEZZER, C.; BARBOSA, G. L.; BAES, C. V. W.; SILVA, V. D.; COSTA, J. C. 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**, São Paulo, v.14, n.5, p.273-275, 2006.
3. BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgery Focus**, Charlottesville, v.16, n.5, p. 01-07, 2004.
4. CEBALLOS, D.; NAVARRO, X.; DUBEY, N.; WENDELSCHAFFER-CRABB, G.; KENNEDY, W.R.; TRANQUILLO, R.T. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. **Experimental Neurology**, New York, v. 158, n. 2, p. 290-300, 1999.
5. CHEN, C.J.; OU, Y.C.; LIAO, S.L.; CHEN, W.Y.; CHEN, S.Y.; WU, C.W.; WANG, C.C.; WANG, W.Y.; HUANG, Y.S.; HSU, S.H. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. **Experimental Neurology**, New York, v. 204, n. 1, p. 443-453, 2007.
6. COLOMÉ, L.M.; GOMES, C.; CROSIGNAN, N.; PAZ, A.H.; LUGO, A.A.; GUIMARÃES, K.M.; FOERSTROW, L.P.; TESSARI, J. P.; COLOMÉ, L. M.; GRAÇA, D.L.; MEURER, L.; PASSOS, E.P.; PIPPI, N. L.; CONTESINI, E.A.; LIMA, E. O.C. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, p.2529-2534, 2008.
7. COLOMÉ, L. M. **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**. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
8. COSTA, M. P.; CUNHA, A. S.; SILVA, C. F.; FILHO, T. E. P. B.; FERREIRA, M. C. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.14, n.1, p.25-29, 2006.
9. CRISCI, A. R. **Estudo experimental dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a regeneração do nervo ciático de ratos após**

- neurotomia, mediante avaliações morfológicas e morfométricas.** 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
10. DELISTOIANOV, N.; PEREIRA, R. N.; DI FILIPPO, P. A.; DORIA, R. G. S.; ALESSI, A. C. Implante de tubo de silicone com e sem colágeno na regeneração de nervos em eqüinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1667 – 1674, 2008.
  11. KEILHOFF, G.; GOIHL, A.; LANGNASE, K.; FANSA, H.; WOLF, G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v.85, n.2, p.11–24, 2006.
  12. LABRADOR, R.O.; BUTI, M.; NAVARRO, X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. **Experimental Neurology**, New York, v. 149, n. 1, p. 243-252, 1998.
  13. MAKWANA, M.; RAIVICH, G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 272, p.2628–2638, 2005.
  14. OLIVEIRA, B.J.N.A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos.** 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
  15. PACHIONI, C. A. MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; FAZAN, V. P. S.; PADOVANI, C. R.; MORO, C. A.; SILVA, C. A. A. Lesão por esmagamento do nervo isquiático de ratos: estudo da vascularização. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.14, n.4, p.203-207, 2006.
  16. PIERUCCI, A. **Influencia do agrecam sobre a migração das células de Schwann in vitro e regeneração nervosa periférica in vivo após transsecção do nervo ciático.** 2004. Dissertação (Mestrado) Biologia celular e estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
  17. PODHAJSKY, R.J.; MYERS, R.R. The vascular response to nerve transection: neovascularization in the silicone nerve regeneration chamber. **Brain Research**, Amsterdam, v. 662, n. 1-2, p. 88-94, 1994.
  18. SKARDA, R. T; TRANQUILI, W. J. Local and regional anesthetic and analgesic techniques: cats. In: TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K.A. **Lumb & Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia**, 4.ed. Philadelphia: Blacwell, 2007. Cap. 21, p.595-604
  19. SOUZA, L. A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares autólogas da medula óssea no reparo do sulco troclear de coelhos.** 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
  20. 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**, Belo Horizonte, v.55, n.5, p. 557-561, 2003.

21. VENTURIM, G. T. **Efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea na frequência de crises e no desempenho cognitivo de ratos com epilepsia induzida por lítio-pilocarpina**. 2008, 92f. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
22. WANG, J.; DING, F.; GU, Y.; LIU, J.; GU, X. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1262, p.7-15, 2009.

## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descoberta do potencial terapêutico das células-tronco no Brasil fez com que a população se manifestasse a favor da liberação irrestrita das pesquisas com células-tronco de origem embrionária. A população foi motivada pelo excessivo sensacionalismo que a mídia abordou sobre as perspectivas terapêuticas dessas células. Assim em 29 de maio de 2008, o Supremo Tribunal Federal liberou as pesquisas científicas com células-tronco embrionárias no Brasil sem nenhuma restrição.

No entanto, o país esbarrou em um entrave econômico. A maioria dos laboratórios não haviam estrutura para trabalhar com este tipo de estudo. Para sanar esse problema o governo Brasileiro disponibilizou milhões em verbas para reestruturar os principais centros de pesquisa do país. Essa iniciativa fez com que aumentasse o número de pesquisas com células-tronco embrionárias. Porém, apesar da descoberta de todo o potencial terapêutico dessas células, persistem ainda grandes incertezas sobre seu comportamento *in vivo*, já que existem alguns riscos como o desenvolvimento de cânceres. Por isso, as pesquisas com células-tronco embrionárias devem ser realizadas com cautela até que se descubram *in vitro* os principais benefícios à saúde humana e animal.

Já a utilização terapêutica das células tronco somáticas (CTS) se consolidou em pesquisas com animais, justificando o seu uso em humanos. No Brasil, há um grande número de ensaios clínicos em andamento com as CTS, principalmente na área de doenças cardíacas e em traumas de medula espinhal. Porém, os resultados somente permitem afirmar que não há efeitos adversos desse transplante e, assim, os efeitos terapêuticos ainda são discutíveis.

As pesquisas com células-tronco devem ser acompanhadas com bastante entusiasmo, porém com bastante cautela. A biologia das células-tronco ainda é uma ciência em formação e cada dia surge resultados que discordam ou corroboram com o conhecimento atual. Até hoje não há controle completo sobre o ritmo de proliferação das células. É preciso encontrar uma espécie de laço de segurança que impeça a multiplicação desenfreada, pois as células-tronco precisam se reproduzir apenas em número suficiente para resgatar uma determinada função orgânica. No entanto, caso se dividam desenfreadamente,

podem originar tumores. Entretanto, ainda há esperança que o tratamento com células-tronco possa substituir tratamentos atuais que são ineficazes para certas doenças, como cânceres e doenças do sistema nervoso. O conhecimento da biologia básica dessas células pode fazer com que em médio prazo possa haver uma melhora na abordagem terapêutica nos tratamentos em humanos e animais.

Já as pesquisas com regeneração de tecidos danificados já é consolidada e os custos superam as de pesquisas com várias outras doenças. Dados dos EUA mostram que são realizados aproximadamente oito milhões de procedimentos cirúrgicos anualmente para o tratamento de tecidos e órgãos lesionados com um custo total de US\$ 400 bilhões. Esses dados demonstram a grande importância desse assunto para a saúde humana. Isto porque, envolve a qualidade de vida dos pacientes e um grande custo do governo com a saúde.

A principal estratégia que vem sendo utilizada para que haja sucesso nessas pesquisas é unir disciplinas como a física, engenharia, biologia e a indústria para se construir planos para uma reparação tecidual adequada. A criação dos guias de nervos é um exemplo que vem trazendo resultados excelentes nos estudos de regeneração nervosa periférica. Dentre os materiais utilizados, acredita-se que os sintéticos possam trazer melhores benefícios pela possibilidade de manipular as propriedades químicas e físicas tornando esses materiais mais atrativos para a pesquisa.

Mesmo com os avanços da tecnologia para reparação tecidual, a recuperação funcional continua sendo uma preocupação para os pesquisadores. O principal problema de lesões de nervos periféricos é a incapacidade funcional que esse tipo de lesão provoca devendo se tornar o principal foco das pesquisas atuais. Assim, conseguindo uma recuperação funcional completa de nervos periféricos e um pleno entendimento dos mecanismos envolvidos nessa regeneração espera-se levar esse conhecimento para o sistema nervoso central (SNC) e tentar enfrentar o grande desafio da neurologia em todos os tempos que é limitar as conseqüências do dano ao SNC e vencer a falta de regeneração espontânea neste sistema.

Em nosso estudo percebemos a veracidade de todos esses problemas citados anteriormente. No capítulo dois trabalhou-se com a parte mais importante de uma regeneração nervosa que é a recuperação funcional. No entanto, algumas

situações imprevistas impediram a obtenção de resultados mais expressivos. Não contávamos com a alteração tão sutil na locomoção que dificultou a avaliação clínica, além disso, a falta de metodologia específica para coelhos também teve importância no momento de se decidir quais avaliações seriam utilizadas. Os exames eletroneurodiagnósticos talvez sejam uma das ferramentas mais importantes a serem empregados em estudos dessa natureza, pois fornecem resultados mais palpáveis quanto à regeneração de nervos periféricos, e precisam ser consideradas para trabalhos futuros.

O capítulo três demonstrou a necessidade de métodos de avaliação histológicos mais minuciosos para se realizar um estudo de regeneração nervosa. A utilização da microscopia eletrônica foi imprescindível para que pudéssemos constatar que as células mononucleares não apresentaram vantagens em relação à solução salina, no entanto, se fosse utilizado apenas os resultados da microscopia óptica, a conclusão do trabalho seria diferente. Além disso, os resultados sugerem que os desdobramentos para os estudos de regeneração nervosa incluem a marcação das células-tronco e das outras células que também participam da regeneração nervosa como as células de Schwann, e assim, poder-se-ia com mais precisão determinar a real participação de células-tronco no processo de recuperação de nervos periféricos.