

ESTUDO COMPARATIVO DA AÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS E FRAGMENTOS DE NERVO NA REGENERAÇÃO DE NERVO TIBIAL EM RATOS

FIBROBLASTS GROWTH FACTOR AND NERVE FRAGMENTS EFFECT ON TIBIAL NERVE REGENERATION IN RATS: A COMPARATIVE STUDY

Celso Kiyoshi Hirakawa¹, Marco Aurélio Sertório Grecco², João Baptista Gomes dos Santos³, Vilnei Matiolli Leite⁴, Flávio Faloppa⁵

RESUMO

Objetivo: Comparar quantitativamente, a estimulação da regeneração do nervo tibial de ratos pelo Fator de Crescimento de Fibroblastos e por fragmentos de nervo dentro tubos de silicone. **Métodos:** Foram utilizados 18 ratos da raça Wistar. A cirurgia consistiu inicialmente na ressecção de um segmento de 8 mm do nervo tibial, seguida da interposição com tubos de silicone. No lado direito, o tubo foi preenchido com solução de Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e, no lado esquerdo, com segmentos do nervo cortados em fragmentos de 1 mm. Após três meses, os animais foram submetidos a nova cirurgia para exposição dos nervos tibiais ao marcador neuronal Fluoro-Gold[®]. Quarenta e oito horas após a exposição ao corante, os ratos foram perfundidos com solução de paraformaldeído e o segmento medular entre L3 e S1 foi removido e cortado em fatias de 40 micrômetros de espessura. **Resultados e conclusão:** os resultados da contagem neuronal mostraram maior quantidade de neurônios no lado onde foi colocado FGF em relação ao lado onde foram colocados fragmentos nervosos, demonstrando que o fator de crescimento de fibroblastos é superior a fragmentos de nervos na estimulação da regeneração nervosa quando colocados no tubo de silicone.

Descritores: Nervos periféricos; Ratos Wistar; Fatores de crescimento de fibroblastos.

Citação: Hirakawa CK, Grecco MAS, Santos JBG, Leite VM, Faloppa F. Estudo comparativo da ação do fator de crescimento de fibroblastos e fragmentos de nervo na regeneração de nervo tibial em ratos. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2007; 15(2): 114-117. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

As lesões de nervos periféricos na mão constituem importante causa de incapacidade funcional, por ser uma lesão frequente nos indivíduos na fase economicamente ativa da vida.

Atualmente, a técnica de reparo mais utilizada é a sutura epineural, utilizando técnicas microcirúrgicas. Porém nas lesões com perda de segmento ou nas lesões crônicas onde ocorre retração dos cotos é necessário o uso de enxerto. A dificuldade nesses casos, é que a retirada do enxerto de nervo periférico implica em causar lesão em área previamente normal, além do resultado final com uso de enxerto ser inferior a sutura término-terminal direta dos cotos.

Novas alternativas tem sido estudadas para que se possa evitar estas complicações. Entre estes estudos, destacamos o uso de veias⁽¹⁾ e artérias^(2,3) os quais por serem materiais biológicos e

SUMMARY

Objective: To quantitatively compare rats' tibial nerve regeneration stimulation by Fibroblast Growth Factor (FGF) and nerve fragments using silicone tubes. **Methods:** 18 Wistar rats were employed in this experiment. The experimental surgery consisted of resection of an 8-mm tibial nerve segment, followed by an interposition of silicone tubes. On the right side, the tube was filled with a Fibroblast Growth Factor (FGF) solution, and on the left side, it was filled with 1 mm nerve segments. After three months, the animals were submitted to an additional surgery for exposing tibial nerves to the neuronal marker Fluoro-Gold[®]. After 48 hours, they were perfused with a paraformaldehyde solution and the medullar segment between L3 and S1 was removed and cut into 40 µm-thick segments. **Results and conclusion:** The results of neuronal counts showed a higher amount of neurons on the side where FGF was used compared to the side where nervous fragments were placed, suggesting a superior performance of the fibroblast growth factor over nerve fragments for stimulating nervous regeneration in silicone tubes.

Keywords: Peripheral nerves; Wistar rats; Fibroblast growth factor.

Citation: Hirakawa CK, Grecco MAS, Santos JBG, Leite VM, Faloppa F. *Fibroblasts growth factor and nerve fragments effect on tibial nerve regeneration in rats: a comparative study.* *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2007; 15(2): 114-117 Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

autógenos, causariam pouca reação, e permitiria conduzir o crescimento do axônio. A dificuldade nesses casos é que ao interpor grandes segmentos, a veia sofre por colabamento, dificultando o crescimento neuronal, enquanto a retirada de segmentos de artéria causa uma diminuição na irrigação na área doadora. Na tentativa de evitar estes problemas, em estudos recentes o uso de tubos de material sintético principalmente de silicone tem sido pesquisados^(4,5,6).

Paralelamente muito se tem estudado a respeito de substâncias neurotróficas, onde se observa a presença de substâncias que estimulariam e orientariam o crescimento dos cotos axonais^(7,8,9,10,11,12).

O objetivo deste trabalho é comparar a ação do Fator de Crescimento de Fibroblastos e fragmentos de nervo, na regeneração de nervo tibial de ratos.

Trabalho realizado no programa de pós graduação da UNIFESP - Escola Paulista de Medicina

Endereço para correspondência: Rua Borges Lagoa, 786 - CEP 04038-002 - São Paulo, SP - E-mail: celsohirakawa@yahoo.com.br

1. Mestre, assistente da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior da UNIFESP

2. Mestre em medicina pela UNIFESP

3. Doutor, Chefe de Clínica de Cirurgia da Mão da UNIFESP

4. Livre-Docente, Chefe da Disciplina de Cirurgia da Mão e Membro Superior da UNIFESP

5. Professor Titular, Chefe do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP

Trabalho recebido em 02/06/06 e aprovado em 27/07/06

MÉTODO

Foram utilizados 18 ratos adultos da raça Wistar, machos, com peso médio de 200 gramas.

Utilizamos anestesia intra-peritoneal, com solução anestésica composta por: hidrato de cloral (4,25 g), sulfato de magnésio (2,25 g), propilenoglicol (4,28 ml), álcool etílico absoluto (11,5 ml), água destilada (45,7 ml). Depois de pesado, o animal recebeu solução anestésica na proporção de 0,4 ml por 100 g de peso.

Uma vez anestesiado, o animal foi submetido à cirurgia onde se realiza incisão póstero-lateral, de cada coxa, com exposição do nervo ciático e suas ramificações - nervo sural, nervo peroneiro e nervo tibial - (Figura 1). Delicadamente dissecamos o nervo tibial direito, manipulando o mínimo possível.

Cuidadosamente seccionamos um segmento de 8 mm do nervo tibial direito, deixando o coto proximal de aproximadamente um milímetro proximal e distal. Em seguida fixamos o coto proximal do nervo no interior do tubo de silicone com fio de nylon 10-0, e infundimos a solução salina de Fator de Crescimento de Fibroblastos a 20 mol, com uma seringa de Hamilton. Após preencher todo o tubo com a solução, fixamos o coto distal do nervo no tubo (Figura 2). Nas extremidades dos tubos utilizamos a cola de fibrina (Beriplast, Aventis[®]) para evitar o extravasamento da solução.

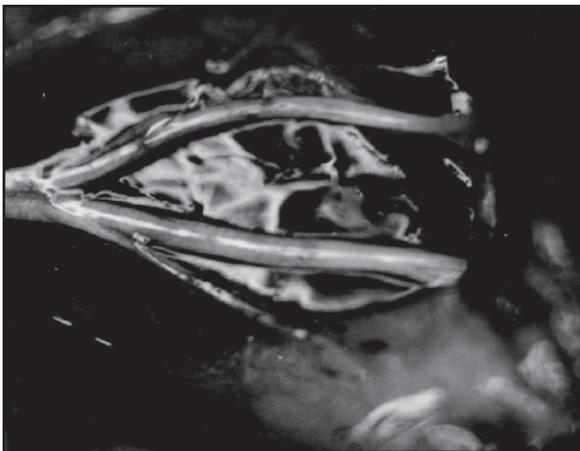


Figura 1. Nervo ciático com seus três ramos

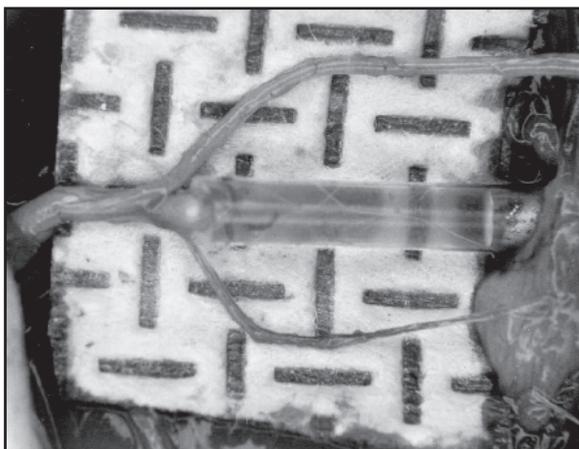


Figura 2. Tubulização do nervo tibial após ressecção de 8 mm.

Realizamos a dissecação e a tubulização do nervo tibial esquerdo da mesma forma que o direito, com a diferença de que no interior do tubo foram introduzidos segmentos de nervo de 1 mm retirados da perna direita.

Após 3 meses, os animais foram reoperados para expor os nervos

tibiais direito e esquerdo, e seccionado o nervo a 1 mm distal à saída do tubo. O coto proximal foi mantido em contato com corante Fluoro-Gold[®] (FG), na concentração de 3% diluído em água destilada por um período de uma hora e 30 minutos.

Após 48 horas da coloração o animal foi novamente anestesiado, com anestesia intraperitoneal usando-se Tionenbutal a 3%, na dosagem de 50 mg por quilograma de peso. Realizamos uma toracotomia, expondo os pulmões e o coração, e a seguir foi introduzido um cateter no ventrículo esquerdo atingindo a luz da aorta. Com uma tesoura, abrimos um grande orifício no átrio direito e imediatamente acionamos a bomba de infusão, ao qual o cateter havia sido previamente ligado.

Ao término da perfusão com solução de paraformaldeído, realizamos a extração da medula espinhal expondo toda a medula dorsolombosacra, ressecamos a dura-máter e identificamos as raízes dorsais de L3, L4, L5, L6 e S1. Acompanhamos o trajeto das raízes de L3 a S1 até sua entrada na medula (limites proximal e distal respectivamente) e nesses pontos seccionamos transversalmente a medula, preservando o segmento medular de L4, L5, L6. Sem retirar o segmento seccionado do seu leito ósseo, cortamos rente à medula as raízes dorsais de L3, L4, L5, L6 e S1.

O segmento de medula foi colocado imerso em solução de 4% paraformaldeído/ tampão fosfato ("solução de perfusão") por 8 horas.

A peça foi então fatiada em secções de 40 μ m de espessura, e montadas em lâminas que permaneceram secando na geladeira (4^o Celsius) por 24 horas.

As lâminas prontas foram examinadas em microscópio ZEISS-AXIOLAB[®] com luz ultravioleta, para evidenciar o marcador. Todas as secções foram examinadas e os neurônios motores corados foram contados (Figura 3). A contagem neuronal foi realizada com aumento de 25 vezes, sendo utilizados aumentos de 50 a 100 vezes quando a presença do marcador não era muito nítida. Foram somados todos os dados de todas as secções.

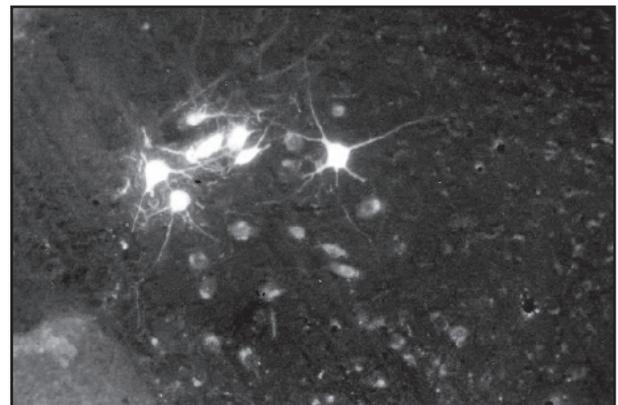


Figura 3: Visualização dos neurônios através da microscopia de fluorescência.

RESULTADOS

A contagem de neurônios pela microscopia de fluorescência apresentou grande variação entre os animais, de 592 a 1920 no lado direito (média de 1171), e 457 a 1556 no lado esquerdo (média de 883). Verificamos, no entanto, que em todos os ratos o lado direito apresentava maior número de células (Tabela 1).

Os valores da tabela 1 foram corrigidos pelo critério de Abercrombie⁽¹³⁾ (Tabela 2), onde multiplica o valor encontrado nos segmentos medulares por 0,65, pois com secção em fragmentos de 40 μ m, poderíamos contar mesma célula em lâminas diferentes. Utilizando este critério, esta contagem em duplicidade estaria anulada.

Análises estatísticas com testes não paramétricos de Wilcoxon sinalizado e o teste paramétrico *T-Student* demonstraram que os dois grupos apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Ratos	Lado Direito	Lado Esquerdo
1	1150	489
2	1920	1293
3	1154	867
4	1448	1144
5	1180	915
6	1824	1556
7	1180	809
8	1690	1370
9	1487	1183
10	1661	1347
11	957	941
12	867	615
13	1275	987
14	1215	693
16	840	721
17	640	509
18	592	457
Total	21080	15896
Média	1171,11	883,11

Tabela 1 - Número de células absolutas contadas no lado direito e esquerdo, valores totais e média.

Ratos	Lado Direito	Lado Esquerdo
1	748	318
2	1248	841
3	750	564
4	941	744
5	748	595
6	1186	1012
7	771	526
8	1099	891
9	967	769
10	1080	876
11	622	612
12	564	400
13	829	642
14	790	451
15	617	438
16	546	469
17	416	331
18	385	297
Total	14307	10776
Média	794,83	598,66

Tabela 2 - Valores da tabela 1 corrigidos pelo critério de Abercrombie para secção de 40 µm.

DISCUSSÃO

Neste estudo utilizamos o fator de crescimento de fibroblastos, uma substância descrita pela primeira vez em 1975⁽¹⁴⁾, que demonstrou ter ação mitogênica, angiogênica e neurotrófica^(15,16,17,18,19).

O mecanismo de ação exata do FGF ainda não é conhecido, embora a capacidade de melhorar a sobrevivência dos neurônios após lesão axonal tenha sido verificada^(18,19). Estudos recentes têm demonstrado a presença de grande quantidade de receptores para FGF nas células de Schwann⁽¹⁸⁾, fato esse que sugere que a ação neurotrófica do FGF ocorre principalmente estimulando o crescimento das chamadas "bandas de Büngner"⁽²⁰⁾. Estas bandas são prolongamentos das células de Schwann que se conectam longitudinalmente, servindo de guia para o crescimento das fibras.

Alguns estudos demonstram que a presença de segmentos de nervo dentro dos tubos melhora a regeneração de fibra nervosa mielinizada, concluindo que estes podem ser fonte adicional de células de Schwann e de fatores neurotróficos⁽²¹⁾.

Decidimos fazer um estudo comparativo da ação neurotrófica entre fragmentos de nervo e fator de crescimento de fibroblastos, uma vez que ambos demonstraram bons resultados na regeneração nervosa em estudos anteriores^(13,14,15,16,17,19).

Vários autores obtiveram bons resultados com tubulização de

nervos com segmento de nervo ou artéria^(1,2,3). O uso de tubos sintéticos apresenta algumas desvantagens com relação ao material biológico, por apresentar uma fibrose mais intensa. Optamos pela utilização do tubo de silicone por ser material mais inerte, apresentando menor reação local, por não colabarem, permitindo o acúmulo de substâncias no interior, e por ser de fácil acesso no nosso meio.

Optamos pela utilização do nervo tibial que é predominantemente motor, pois estudos com nervos mistos como o ciático podem levar a lesões como ulcerações e autofagia do membro, além de dificuldade na deambulação e alimentação. Fizemos ressecção de 8 mm pois o nervo tibial no acesso utilizado tem extensão aproximada de 10 mm, sendo assim, restaram cerca de 1 mm em cada extremidade. A manutenção deste pequeno segmento do coto foi importante para que pudéssemos introduzi-lo dentro da luz do tubo.

O intervalo entre a primeira e a segunda cirurgia foi de três meses, evitando esperar por um tempo mais prolongado para evitar maiores perdas de animais. Ao observarmos os animais antes da segunda cirurgia, verificamos que os mesmos apresentavam boa função dos membros, não sendo constatado claudicação como ocorria logo após a primeira intervenção cirúrgica.

Utilizamos a técnica da contagem neuronal na medula após coloração do coto distal ao enxerto com Fluoro-Gold. Esta técnica permite avaliação mais fidedigna do número de células que atinge

a extremidade distal do enxerto, pois no axônio seccionado ocorre "um brotamento" com várias ramificações. Um estudo do segmento distal do nervo poderia levar a valor superestimado dos axônios regenerados, pois estas inúmeras ramificações dos cotos sofrem amputação fisiológica com o tempo⁽²²⁾.

As medulas foram submetidas a cortes histológicos de 40µm, espessura que permite grande sensibilidade nas contagens de células marcadas, mas que aumenta também a possibilidade de um mesmo neurônio ser contado em cortes diferentes. Devido a esse fato, utilizamos o método de correção de Abercrombie⁽¹³⁾, no qual se multiplica o resultado por 0,65, tornando o resultado próximo do número real de células.

Através das análises estatísticas verificamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os lados, sendo que o lado que recebeu o FGF teve maior contagem neuronal do que o lado com segmentos de nervos.

Analisando a tabela de resultados, verificamos que houve grande diferença no número de células entre os animais, variando de 385 a 1248 no lado direito, e de 297 a 1012 no lado esquerdo. Importante ressaltar que as proporções entre o esquerdo e direito se mantiveram, não alterando portanto a análise estatística.

A grande variedade no número de células de um rato para outro pode ser explicada pela característica individual do animal, também verificado em trabalhos anteriores⁽²²⁾. Devido a essa variabilidade, utilizamos o teste t-pareado, no que retira o efeito individual do animal, testando a média das diferenças de cada rato. Neste teste, verificamos a correlação linear de Pearson entre os lados, que pode variar de zero a um. No nosso caso mostrou-se bem elevada (0,942), indicando que os lados reagem da mesma forma para cada uma das metodologias aplicadas.

Para análise dos resultados utilizamos também o teste de Mann-Whitney, o que analisa os lados como entidades isoladas. Este teste trabalha com a média dos postos de cada grupo, não retirando o efeito individual dos ratos. O teste de Wilcoxon analisa também os postos, verificando as diferenças de cada rato. Todos os testes demonstraram que havia diferença estatisticamente significativa.

O uso de tubo de silicone como enxerto de nervo periférico tem sido objeto de pesquisa de inúmeros autores, porém os resultados mostraram que não podem ser usados como substituto de enxerto de nervo autólogo. Alguns bons resultados^(6,23) são discordantes de outros, que mostram que ainda não temos o enxerto ideal⁽²⁴⁾.

Outras alternativas que parecem oferecer também caminhos promissores são os usos de materiais biológicos para tubulização, como artérias e veias.

A associação entre o uso de material biológico e um fator de crescimento deve, teoricamente, promover regeneração mais adequada, no entanto neste caso deparamos com a dificuldade técnica na infusão da solução e para impedir o extravasamento do líquido.

A importância das células de Schwann foi demonstrado em vários estudos, e a presença de fragmentos do nervo dentro do tubo pode ser uma fonte adicional destas células⁽²¹⁾. Apesar disso, no nosso estudo este método se mostrou inferior para promover regeneração nervosa.

O fator de crescimento de fibroblastos tem se mostrado bastante promissor, tendo demonstrado resultados semelhantes ou até superiores ao enxerto de nervo tradicional⁽²⁴⁾. No nosso estudo verificamos que houve melhores resultados do que com fragmentos de nervos, mas quando comparamos número de células contadas em cada rato com outros trabalhos que utilizaram a mesma metodologia, verificamos que o enxerto de nervo autólogo ainda promove melhor regeneração nervosa periférica⁽²⁵⁾.

Desde o relato das primeiras neurocinas, novas perspectivas se abriram para melhorar a regeneração nervosa, entretanto, até o momento nenhum destes fatores possibilitou um crescimento neuronal totalmente satisfatório.

Os inúmeros trabalhos publicados sobre a regeneração nervosa mostram a grande preocupação com esta questão que ainda permanece obscura. A melhor compreensão dos fenômenos bioquímicos parece ser fundamental para desenvolvimento do

método de tratamento ideal. O uso de substâncias neurotróficas exógenas têm demonstrado resultados animadores, e provavelmente a associação com métodos de tubulização adequada possa futuramente melhorar a recuperação dos pacientes com lesões nervosas. Este estudo demonstrou que a simples presença das células de Schwann adicionadas na forma de fragmentos de nervo não foi suficiente para regeneração desejada. Baseado em evidências de que o FGF atua principalmente nas células de

Schwann, a associação dos dois produtos – o FGF e fragmentos de nervos – talvez nos traga a solução desejada, a de conseguir um substituto ideal para o enxerto de nervo.

CONCLUSÃO

A tubulização com fator de crescimento de fibroblastos promoveu melhora significativa na regeneração nervosa do que com fragmentos de nervos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ely JB, Calteux N. Envelope venoso - contribuição experimental à cirurgia dos nervos periféricos. *Rev AMRIGS*. 1983; 27:454-61.
2. Weiss P. The technology of nerve regeneration: a review. Sutureless tubulation and related methods of nerve repair. *J. Neurosurg*. 1944; 1:400-49.
3. Weiss P. Reunion of stumps of small nerves by tubulation instead of suture. *Science*. 1941; 93:66-8.
4. Politis MJ, Ederle k, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derives from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res*. 1982; 253:1-12.
5. Lundborg G, Longo FM, Varon S. - Nerve regeneration model and trophic factors in vivo. *Brain Res*. 1982; 232:157-61.
6. Braga-Silva J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg Br*. 1999; 24:703-6.
7. Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S. Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science*. 1979; 204:1434-6.
8. Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Sci*. 1986; 83:9739-43.
9. Gama SAM. Estudo comparativo das neurocinas Cardiotrofina 1 e Oncostatina M na regeneração nervosa periférica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000.
10. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends Neurosci*. 1995; 18:83-8.
11. Richardson PM, Lu X. Inflammation and axonal regeneration. *J Neurol*. 1994; 241:557-60.
12. Hirakawa CK. Estudo comparativo da ação do fator de crescimento de fibroblastos e fragmentos de nervos na regeneração de nervo tibial em ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002.
13. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*. 1946; 94:239-47.
14. Gospodarowicz D, Moran JS. Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage cultures of human and murine fibroblasts. *J Cell Biol*. 1975; 66:451-7.
15. Gospodarowicz D. Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing, and neoplastic growth. *Prog Clin Biol Res*. 1976; 9:1-19.
16. Anderson KJ, Dam D, Lee S, Cotman CW. Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons in vivo. *Nature*. 1988; 332:360-1.
17. Danielsen N, Pettmann B, Vahlsing HL, Manthorpe M, Varon S. Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *Neurosci Res*. 1988; 20:320-30.
18. Ely JB, Calteux AN. Envelope venoso contribuição experimental à cirurgia dos nervos periféricos. *Rev AMRIGS*. 1983; 27:454-61.
19. Lee TT, Green BA, Dietrich WD, Yeziarsky RP. Neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor following spinal cord contusion injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1999; 16:347-56.
20. Kayton RJ, Aktas RG. Electron microscopic immunolocalization of basic fibroblast growth factor in peripheral nerves. *Histochem Cell Biol*. 2000; 114:413-9.
21. Smahel J, Jentsch B. Stimulation of peripheral nerve regeneration by an isolation nerve segment. *Ann Plast Surg*. 1986; 16:494-500.
22. Leite VM. Estudo do comportamento das lesões altas do nervo ciático através da utilização de Fluoro-Gold e Horseradish Peroxidase como marcadores neuronais [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1994.
23. Lolley RD, Bose WJ, Bastian F, Bassam B, Meyer FN, Anderson LD. Vein silastic, and polyglycolic acid fine mesh: a comparative study in peripheral nerve repair. *Ann Plast Surg*. 1995; 35:266-71.
24. Grothe C, Nikkhah G. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anat. Embryol*. 2001; 204:171-7.
25. Grecco MAS, Leite VM, Albertoni WM. Estudo da regeneração nervosa em nervos tibiais de ratos wistar utilizando o Fluoro Gold como marcador neuronal. *Acta Ortop Brás*. 2003; 11:225-9.