

# 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

## BONE MARROW AND PLATELET-RICH PLASMA STEM CELLS EFFECTS ON NERVOUS REGENERATION AND FUNCTIONAL RECOVERY IN AN ACUTE DEFECT MODEL OF RATS' PERIPHERAL NERVE

JEFFERSON BRAGA-SILVA<sup>1</sup>, DANIEL GEHLEN<sup>6</sup>, JAVIER A. ROMAN<sup>2</sup>, CAROLINE MENTA<sup>6</sup>, EDUARDO DE ANDRADE ATKINSON<sup>6</sup>, DENISE CANTARELLI MACHADO<sup>3</sup>, CHRISTIAN VIEZZER<sup>6</sup>, GUSTAVO LEIVAS BARBOSA<sup>6</sup>, CRISTIANE VON WERNE BAES<sup>6</sup>, VINÍCIUS DUVAL SILVA<sup>4</sup>, JADERSON COSTA DA COSTA<sup>5</sup>

### RESUMO

**Objetivos:** Foram avaliados os efeitos do uso de células tronco da medula óssea (CTM) e do plasma rico em plaquetas (PRP) na regeneração de nervos periféricos, utilizando um modelo estabelecido de regeneração de nervo ciático em ratos. **Métodos:** Um defeito nervoso de 10 mm foi reconstruído com a utilização de um tubo de silicone preenchido com CTM, PRP ou ambos. O grupo controle recebeu somente o tubo de silicone. Foi realizado ainda um quinto grupo no qual o intervalo foi reconstruído utilizando o segmento ressecado do nervo. A função motora foi testada seis semanas após a cirurgia utilizando teste de marcha. Após o teste motor, os ratos foram anestesiados, o nervo ciático e o tubo foram ressecados e foi realizada microscopia eletrônica de transmissão. **Resultados:** A análise quantitativa demonstra uma melhora na recuperação funcional no grupo CTM em comparação com os demais grupos. Regeneração nervosa foi demonstrada no grupo CTM por microscopia eletrônica de transmissão com uma recuperação praticamente completa da anatomia neural. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que o uso de CTM associado com a técnica de tubulização promove uma satisfatória recuperação da função motora e regeneração nervosa.

**Descritores:** Células tronco; Nervos periféricos; Modelos animais.

**Citação:** Braga-Silva J, Gehlen D, Roman JA, Menta C, Atkinson EA, Machado DC, et al. Efeitos das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2006; 14(5):273-275. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

### INTRODUÇÃO

Apesar do enxerto nervoso autólogo ser uma das opções no tratamento de injúrias nervosas no qual o reparo primário não pode ser realizado sem a utilização de tensão excessiva, existem algumas dificuldades na utilização desta técnica, como o ajuste do comprimento e do diâmetro do enxerto. Inúmeras tentativas têm sido feitas para induzir a regeneração nervosa em defeitos nervosos utilizando materiais não biológicos como tubos de silicone<sup>(1,2,3)</sup>. No

### SUMMARY

**Objectives:** The effects of the use of bone marrow stem cells (MSC) and platelet-rich plasma (PRP) on peripheral nerves regeneration were assessed by using an established model of sciatic nerve regeneration in rats. **Methods:** A 10-mm nervous defect was reconstructed by using a silicone tube filled with MSC, PRP or both. The control group received only the silicone tube. A fifth group was also set, in which the interval was reconstructed by using a dried segment of the nerve. Motor function was tested six weeks after surgery, by means of a gait test. After motor test, the rats were anesthetized, the sciatic nerve and the tube were dried, and the transmission electronic microscopy was performed. **Results:** The quantitative analysis shows an improved functional recovery in MSC group compared to the other groups. Nervous regeneration was reported for MSC group by means of transmission electronic microscopy with an almost full recovery of the neural anatomy. **Conclusion:** Our results suggest that the use of MSC combined with tubing technique yields a satisfactory recovery of motor function and nervous regeneration.

**Keywords:** Stem Cells; Peripheral Nerves; Models, Animal.

**Citation:** Braga-Silva J, Gehlen D, Roman JA, Menta C, Atkinson EA, Machado DC, et al. Bone marrow and platelet-rich plasma stem cells effects on nervous regeneration and functional recovery in an acute defect model of rats' peripheral nerve. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2006; 14(5):273-275. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

entanto, a capacidade de indução de regeneração nervosa dos materiais não biológicos tem sido considerada inadequada, e o desenvolvimento de nervos artificiais combinando células, como as de Schwann<sup>(4,5)</sup> e fatores neurotróficos<sup>(6,7)</sup> juntamente com materiais não biológicos, tem sido utilizado atualmente.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das células da medula óssea, do plasma rico em plaquetas e da combinação de ambos na regeneração de nervos periféricos em comparação com as técnicas

Trabalho realizado no Serviço de Cirurgia da Mão e Microcirurgia Reconstructiva, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil e Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Endereço para correspondência: Av. Ipiranga 6690 - Centro Clínico PUCRS, Sala 216, CEP 90610-000, Porto Alegre, Brasil - Email: [jeffmao@terra.com.br](mailto:jeffmao@terra.com.br)

- 1 - Professor Livre Docente em Cirurgia da Mão pela UNIFESP.
- 2 - Médico Ortopedista e Traumatologista.
- 3 - Bióloga da Faculdade da PUCRS.
- 4 - Professor de Patologia da Faculdade de Medicina da PUCRS.
- 5 - Diretor do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.
- 6 - Acadêmico em Medicina.

Trabalho recebido em 24/04/06 aprovado em 07/07/06

atualmente utilizadas para o tratamento de lesões em nervos periféricos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Isolamento e Cultura das Células Tronco de Medula Óssea

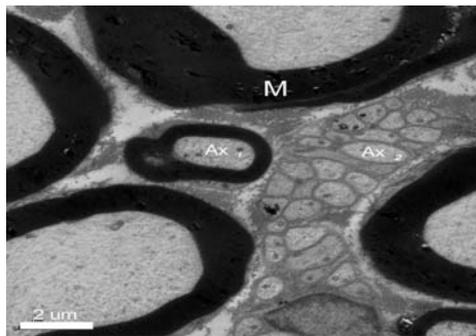
O isolamento de células tronco da medula óssea foi realizado após administração de uma dose letal de Ketamina e Clorpromazina. Tíbia e fêmur foram dissecados. A medula foi retirada com 1 ml de DBPS (Gibco TM, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) utilizando uma agulha de 0,8X25mm (21 Gauze). As células tronco da medula óssea foram lavadas duas vezes com 1 ml de DBPS para meios de centrifugação por 30 segundos a 700G. Finalmente, as células foram ressuspensas a uma densidade de  $10^7$  células/ml de DBPS.

### Preparo do Plasma Rico em Plaquetas

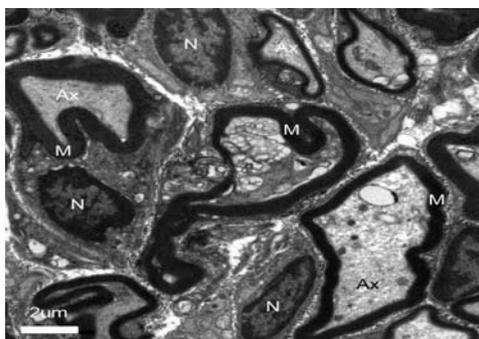
O plasma rico em plaquetas foi preparado usando coleção obtida por punção cardíaca com um tubo contendo citrato de sódio. A amostra foi centrifugada em 160G. por 8 min e uma fração de 10 mm sobre eritrócitos, contendo a fração de plasma rico, foi removida. Gluconato de cálcio (10%) foi adicionado e o tubo foi incubado em 37°C até a solução tornar-se viscosa. Plasma rico em plaquetas foi utilizado para ressuspender as células tronco da medula óssea a uma densidade de  $10^7$  células.

### Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da nossa instituição e foram conduzidos de acordo com o Guia de Princípios para Pesquisa Envolvendo Animais e Seres Humanos, tomando as medidas adequadas para minimizar a dor e o desconforto dos animais. Quarenta e oito ratos adultos fêmeas da linhagem Wistar foram anestesiados sob injeção intramuscular de uma solução composta por Ketamina™ (Ketamin-S(+)) 50 mg/ml 70mg/kg e Xylazina (100mg/ml) 10 mg/kg. O nervo ciático foi abordado no aspecto lateral da coxa direita. Um segmento de 10 mm do nervo foi ressecado e defeito foi imediatamente reconstruído. Os animais foram divididos em cinco grupos de acordo com a técnica utilizada para reconstrução. Nos grupos 1 a 4, o defeito foi reconstruído com um tubo de silicone flexível (comprimento médio: 14 mm e diâmetro médio: 0,8 mm). O epineuro foi suturado a um ponto situado a 2 mm de distância da extremidade do tubo. A extremidade do nervo foi completamente introduzida no interior do lúmen do tubo produzindo um compartimento fechado. Os grupos foram divididos de acordo com a preparação usada para preencher o lúmen do tubo. Grupo 1: tubo vazio (TV); Grupo 2: células tronco da medula óssea (CTM); Grupo 3: plasma rico em plaquetas (PRP); Grupo 4 (CTM + PRP);



**Figura 1** - Microscopia eletrônica de transmissão de um nervo do grupo TV. Secção transversal de um nervo mostrando bainha de mielina (M), alguns axônios mielínicos na região central esquerda (Ax 1) e amielínicos na região central direita (Ax 2).



**Figura 2** - Microscopia eletrônica de transmissão de um nervo regenerado dentro de um tubo preenchido com células tronco medulares. Secção transversal de um segmento de nervo dentro do tubo de silicone demonstrando inúmeros axônios mielínicos (Ax), bainhas mielínicas (M) e núcleos de células de Schwann (N).

associação de células tronco da medula óssea e plasma rico em plaquetas. O intervalo foi reconstruído utilizando o segmento ressecado do nervo como um autoenxerto no grupo 5 (AE), o qual foi suturado utilizando técnica convencional. Em virtude da previsibilidade dos resultados nos grupos controle (grupos 1 e 5) o número de animais foi a metade ( $n=06$ ) do estabelecido para os demais grupos experimentais ( $n=12$ ). Após cirurgia, todos animais permaneceram saudáveis durante o estudo.

### Análise Funcional e Histológica

Testes de marcha foram obtidos de acordo com o método de Medinaceli<sup>(8,9)</sup>, 10 semanas após a cirurgia. Elas foram medidas utilizando um bloco de digitalização conectado a um computador pessoal utilizando um software morfométrico. O Índice de Função Ciática (IFC) foi obtido para cada animal. Os IFC de diferentes grupos experimentais foram comparados utilizando análise de variância e Teste de Tukey post-hoc. Em todas análises estatísticas  $p < 0,05$  foi considerado como sendo estatisticamente significativo. Os animais foram sacrificados logo após a realização dos testes de marcha. Foi utilizada microscopia eletrônica de transmissão para a avaliação da regeneração do nervo dentro do tubo preenchido com CTM e no grupo controle (Grupo TV), no qual foi utilizado apenas o tubo de silicone sem CTM (Figuras 1 e 2).

### RESULTADOS

O Índice de Função Ciática (IFC) foi obtido para cada animal, após 10 semanas do procedimento cirúrgico. Os grupos foram comparados todos juntamente e, também, entre dois a dois. Os resultados são demonstrados na Tabela 1 e no Gráfico 1, conforme média  $\pm$  DP. A análise quantitativa dos IFC, sugere uma melhora da recuperação funcional no grupo CTM em comparação com os demais grupos, demonstrada através da obtenção de melhores resultados no teste de marcha, sendo seguido pelos grupos PRP e CTM+PRP, os quais foram estatisticamente equivalentes. O seguinte melhor resultado foi observado no grupo AE. O grupo TV apresentou os piores resultados, demonstrando uma maior dificuldade para recuperação da função motora.

A regeneração nervosa foi demonstrada no grupo CTM por microscopia eletrônica de transmissão através de uma quase completa recuperação da anatomia neural. Axônios mielínicos e amielínicos foram identificados em quantidade adequada dentro do tubo preenchido com CTM (Figura1). No grupo em que foi utilizado apenas o tubo de silicone houve regeneração, porém bem menos significativa com relação ao grupo anterior. O grupo TV apresentou um crescimento mais lento e em menor quantidade de fibras nervosas, bem como

**Tabela 1** - Média do índice de função ciática de acordo com cada tipo de tratamento.

	Grupo de Tratamento				
	TV	CTM	PRP	CTM + PRP	AE
MÉDIA	-85.1000	- 27.5164*	- 43.1911	- 41.8642	-51.3200
E. P.	0.9798	0.8414	2.0810	1.0630	1.4906
D. P.	0.4000	2.7905	6.2431	3.6825	0.6666

Índice de Função Ciática: Mede a perda de função. Quanto mais próximo de zero, melhor função de marcha.  
TV: Tubo Vazio; CTM: Células Tronco derivadas da Medula Óssea, PRP: Plasma Rico em Plaquetas; AE: Autoenxerto.  
E.P.: Erro Padrão; D.P.: Desvio Padrão  
\*  $p < 0,05$

uma menor organização dessas e um menor número de axônios mielinizados (Figura 2).

## DISCUSSÃO

Células tronco humanas adultas são capazes de manter, gerar e substituir células terminalmente diferenciadas em seus tecidos específicos como uma conseqüência do turnover celular fisiológico ou regeneração tecidual devida à injúria<sup>(10)</sup>. Estudos recentes sugerem que células tronco adultas geram células diferenciadas além de suas capacidades teciduais específicas, um processo chamado de “plasticidade desenvolvvente”<sup>(11)</sup>.

Já foi demonstrado que não apenas células tronco derivadas de tecido embrionário ou neural<sup>(12)</sup>, mas também outras células tronco específicas de órgãos, podem gerar fenótipos neurais<sup>(13,14)</sup>.

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, as mesmas 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 auto-enxerto autólogo, que, por sua vez, está associada, muitas vezes, a dificuldades técnicas que impossibilitam a realização de tal técnica pelo cirurgião. Nosso estudo demonstra que a utilização de células tronco não somente é uma alternativa significativa, bem como apresenta resultados superiores em relação a outras técnicas também realizadas. Estudos in vivo têm mostrado que as células tronco de medula óssea têm um importante potencial regenerativo após serem transplantadas em extremidades de nervos ciáticos transecionados<sup>(15,16)</sup>.

O presente estudo demonstrou que a performance funcional avaliada pela análise do teste de marcha dos ratos tratados com tubulização e células tronco da medula óssea foi significativamente melhor do que em todos os demais grupos. O efeito benéfico do

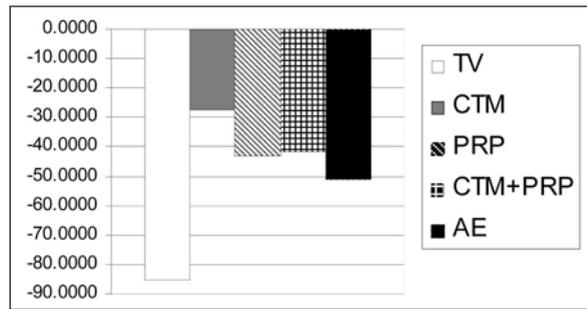


Gráfico 1 - Índice de Função Ciática dos diferentes grupos observados no estudo.

PRP foi também demonstrado. Os resultados do grupo CTM + PRP são fáceis de interpretar quando comparados com o grupo CTM e o grupo PRP.

O possível efeito adicional da preparação de células tronco quando associado com PRP foi analisado, já que os escores dos grupos PRP e CTM + PRP foram estatisticamente os mesmos. Uma interpretação possível é que a preparação de PRP de alguma forma inibe os efeitos CTM, parcialmente ou até completamente.

Nossos dados sugerem que as CTM injetadas dentro do tubo de silicone induzem a proliferação e diferenciação de Células de Schwann promovendo uma regeneração mais rápida e mais abundante, com a formação de um maior número de fibras mielinizadas, permitindo assim uma maior recuperação funcional quando comparados aos demais grupos estudados.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o uso de células tronco da medula óssea de ratos associado a técnica de tubulização promove uma melhor recuperação da função motora e uma regeneração mais abundante em um modelo de defeito nervoso agudo quando comparado aos demais grupos avaliados nesse estudo.

O mecanismo exato responsável por este feito não é completamente compreendido. Pesquisas adicionais são necessárias para compreender os mecanismos de diferenciação ocorridos no interior do tubo preenchido com a preparação de células tronco adultas da medula óssea capaz de promover a indução da regeneração nervosa.

O uso de células tronco adultas autólogas é um forte candidato 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.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Yoshii S, Oka M. Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. *Brain Res.* 2001; 888:158-62.
- Zhao Q, Lundborg G, Danielsen N, Bjursten LM, Dahlin LB. Nerve regeneration in a "pseudo-nerve" graft created in a silicone tube. *Brain Res.* 1997; 769:125-34.
- Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res.* 2004; 26:151-60.
- Mimura T, Dezawa M, Kanno H, Sawada H, Yamamoto I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg.* 2004; 101:806-12.
- Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci.* 2001; 14:1771-6.
- Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31:615-9.
- Mazor Z, Peleg M, Garg AK, Luboshitz J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent.* 2004; 13:65-72.
- De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt AJ. Na index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77:634-9.
- De Medinaceli L, Wyatt AJ. Neurobehavioral evaluation of function following experimental nerve damage. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1984; 6: 415-7.
- Slack JMW. Stem cells in epithelial tissue. *Science.* 2000; 287:1431-3
- Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med.* 2003; 349:570-82.
- Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, et al. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res.* 2003; 974:17-24.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000; 61:364-70.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Verfaillie CM, Keene DC, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002; 174:11-20.
- Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Transplantation of cultured bone marrow stromal cells to improve peripheral nerve regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34:537-42.
- Pereira Lopes FR, Camargo de Moura Campos L, Dias Correa J Jr, Balduino A, Lora S, Langone F, et al. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp Neurol.* 2006; 198:457-68.
- Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez-Corochano R, Diaz-Gonzalez D, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res.* 2002; 24:634-8.