

INFLUÊNCIA DA IMUNOSSUPRESSÃO NA REGENERAÇÃO NERVOSA COM UTILIZAÇÃO DE ALOENXERTOS. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

INFLUENCE OF IMMUNOSUPPRESSION ON NERVE REGENERATION USING ALLOGRAFTS: AN EXPERIMENTAL STUDY ON RATS.

PAULO TUMA JÚNIOR¹, MARCUS CASTRO FERREIRA², HUGO ALBERTO NAKAMOTO³, DIMAS ANDRÉ MILCHESKI³, AYLTON CHEROTO FILHO⁴

RESUMO

A enxertia alógena de nervo teve seu interesse renovado após o desenvolvimento de melhores drogas imunossupressoras. Neste trabalho estudou-se a enxertia alógena de nervo utilizando a técnica de planimetria por contagem de pontos. Foram considerados três grupos: Grupo A - ratos Lewis que receberam enxertos de nervo de doadores isogênicos; Grupo B - ratos Lewis que receberam enxertos de nervo de ratos doadores Brown-Norway e foram tratados com solução salina; Grupo C - ratos Lewis que receberam enxertos de nervo de ratos doadores Brown-Norway e foram tratados com ciclosporina. A regeneração neural foi avaliada por análise histológica e estudos histomorfométricos depois de 6 e 12 semanas. Com 6 semanas, a densidade de fibras neurais e a porcentagem de tecido neural no grupo de enxertos alógenos com imunossupressão (grupo C) era significativamente mais alta do que no grupo B. Os grupos de enxertos alógenos (grupo B e C) mostraram densidade menor de fibras de nervo e porcentagem de tecido neural que no grupo de enxerto autógeno (grupo A) tanto com 6 quanto com 12 semanas. O método de planimetria por contagem de pontos produziu resultados precisos e reprodutíveis.

Descritores: Regeneração nervosa; Ciclosporina; Microcirurgia.

SUMMARY

Purpose. This paper was aimed to study nerve regeneration after allografting using conventional point counting technique.

Introduction. The interest towards nerve allografting has been growing since the recent development of better immunosuppressant drugs.

Methods. Three groups were studied: Group A - Lewis rats receiving nerve grafts from isogenic donors; Group B - Lewis rats receiving nerve grafts from Brown-Norway donor rats and treated with saline solution; Group C - Lewis rats receiving nerve grafts from Brown-Norway donor rats and treated with cyclosporine. Nerve regeneration was evaluated by histological analysis and by histomorphometric studies after 6 and 12 weeks.

Results. At 6 weeks, nerve fiber density and the percentage of neural tissue in the immunosuppressed allograft group (C) were significantly higher than in group B. Allograft groups (B and C) showed significantly lower nerve fibers density and percentage of neural tissue when compared to the autograft group A at 6 or 12 weeks.

Conclusions. We conclude that the point counting method was simpler to use than the computerized model, and yielded accurate and reproducible results.

Keywords: Nerve regeneration; Cyclosporine; Microsurgery.

Citação: Tuma Júnior P, Ferreira MC, Nakamoto HA, Milcheski DA, Cheroto Filho A. **Influência da imunossupressão na regeneração nervosa com utilização de aloenxertos: estudo experimental em ratos.** Acta Ortop Bras. [periódico na Internet]. 2008; 16(1):41-44. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Tuma Júnior P, Ferreira MC, Nakamoto HA, Milcheski DA, Cheroto Filho A. **Influence of immunosuppression on nerve regeneration using allografts: an experimental study on rats.** Acta Ortop Bras. [serial on the Internet]. 2008; 16(1):41-44. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO:

A terapêutica cirúrgica em pacientes com lesão periférica de nervo apresentou mudanças nas últimas décadas principalmente devido ao uso de enxertos autógenos, ao desenvolvimento da magnificação intra-operatória e à demonstração dos efeitos deletérios da tensão no sítio de reparo neural.

Apesar do progresso obtido, os resultados quanto ao retorno da função ainda não são perfeitos. Além disso, a coleta de nervo doador cria uma nova seqüela neurológica. Nos defeitos extensos ou em defeitos de vários nervos no mesmo paciente, pode não haver nervo doador autógeno suficiente para preencher a falha neural. Com o aumento da capacidade de entendimento e com a manipulação do sistema imunológico, os enxertos alógenos têm sido propostos como um método alternativo nas reconstruções periféricas de nervo.

A medicação ciclosporina tem sido amplamente utilizada nos transplantes de órgãos em associação com outras drogas, permitindo redução significativa da morbidade quando comparado aos esquemas iniciais de imunossupressão⁽¹⁾. O uso da ciclosporina em transplante de órgãos não vitais como pele, nervo, músculos e extremidades tem sido relatado em alguns estudos⁽²⁻⁵⁾.

O mecanismo de ação da ciclosporina na regeneração nervosa ainda é controverso⁽⁶⁻⁹⁾. E, dessa maneira, a ciclosporina tem sido substituída pela medicação FK-506 em diversos protocolos de aloenxertos com nervo⁽¹⁰⁾. Série de estudos demonstraram regeneração mais favorável em pequenos aloenxertos neurais periféricos com o FK-506 quando comparado à ciclosporina em modelos experimentais com ratos^(11, 12).

Recentemente surgiram novas estratégias em bioengenharia de nervos periféricos combinados com o uso de ciclosporina para

Trabalho realizado no Laboratório de Microcirurgia- Laboratório de Investigação Médica(LIM 04) da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

Endereço para correspondências: Avenida Doutor Silva Melo, 132, ed Aruá apto 301. São Paulo - SP - Brasil - CEP 04675-010 - E-mail: hugonakamoto@yahoo.com.br

1. Médico Assistente da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP
2. Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP
3. Médico Assistente da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP
4. Pós Graduando da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

Trabalho recebido em 13/04/07 aprovado em 24/05/07

induzir tolerância e para aumentar a viabilidade das células transplantadas^(13, 14).

Em modelos experimentais a avaliação da regeneração nervosa tem sido feita principalmente através de métodos computadorizados, embora a avaliação morfométrica convencional ainda continue sendo utilizada na avaliação em fígado e de outras patologias^(2,5,6,15). Parece ser lógica a utilização de modelos morfométricos convencionais na avaliação de regeneração nervosa, principalmente em países onde tecnologia mais sofisticada não se encontra facilmente acessível.

O objetivo do presente artigo, um estudo experimental em ratos utilizando aloenxertos nervosos, é o de avaliar, com técnica morfométrica de planimetria por contagem de pontos, a regeneração neural em enxertos alógenos de nervo com e sem imunossupressão.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 30 ratos isogênicos da linhagem Lewis (Lew) e da linhagem Brown-Norway (BN), pesando entre 200 e 300 g. Estas espécies diferem ao nível do locus de histocompatibilidade maior⁽¹⁶⁾.

Três grupos foram estabelecidos (Tabela 1). O grupo dos ratos Lewis recebeu enxertos de nervo de doadores Lewis singênicos (grupo A) ou enxertos de nervo de ratos alógenos Brown-Norway, sem imunossupressão (grupo B). O grupo C (Lew x BN) recebeu imunossupressão pós-operatória com solução de ciclosporina A (CsA) na dose de 5 mg/kg/dia, administrada diariamente através de injeção subcutânea. Nos grupos A (Lew x Lew – grupo controle autogênico) e B (Lew x BN – grupo controle alógeno) os animais receberam injeções diárias de solução salina. Os ratos foram sacrificados com 6 e 12 semanas de pós-operatório.

Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos seguiram a técnica microcirúrgica padrão, utilizando microscópio cirúrgico. Através de divulsão da musculatura glútea o nervo ciático foi exposto bilateralmente e um enxerto de 1,5 cm foi removido em cada lado nos animais doadores. O nervo ciático do lado direito dos animais receptores foi exposto de maneira similar e uma falha neural de 0,5 cm foi criada. Os enxertos de nervo foram então transferidos e suturados com fio de nylon 10.0 com pontos epineurais.

Estudos Morfométrico e Histológico

Após o sacrifício, um fragmento do nervo ciático, incluindo uma porção distal ao enxerto, era removido e fixado através de imersão em uma solução de glutaraldeído a 2% (wt/vol). O tecido era pós-fixado com tetróxido de ósmio e embebido em hidroxietilmetacrilato. Azul de toluidina foi utilizado para corar secções transversas de 2 μ m de espessura para posterior exame em microscopia ótica. Fatias do segmento distal do enxerto alógeno foram estudadas por um observador independente que avaliou a arquitetura global do nervo, a qualidade e quantidade de regeneração das fibras, o grau de mielinização e a presença ou ausência de degeneração Walleriana.

O exame histológico quantitativo foi realizado em secções transversas do nervo receptor 5 mm distal à linha de sutura, utilizando a técnica morfométrica convencional através do procedimento de planimetria por contagem de pontos⁽¹⁷⁾. A coleta de dados foi feita por um observador sem acesso ao tipo de grupo estudado, superpondo um retículo de 1 cm² com 100 pontos e linhas Zeiss tipo II para as imagens histológicas observadas no microscópio. Com uma magnificação de 1000x, 10 campos histológicos foram randomicamente escolhidos e avaliados. Todas as fibras mielinizadas que estavam superpostas com as linhas de retículo eram contadas. Com estas medidas primárias os seguintes índices morfométricos foram calculados: densidade das fibras (número de fibras / μ m² - DF), porcentagem de tecido neural (área ocupada pelo tecido neural / área total de secção transversa do nervo - PTN) e área média da fibra (μ m² - AMF) de cada segmento neural.

Análise Estatística

Uma análise global das diferenças médias nos grupos foi calculada com a análise de perfil para as três variáveis morfométricas. Com esta técnica multivariada foram testadas as seguintes hipóteses básicas:

H₀₁: os perfis das médias são paralelos;

H₀₂: os perfis das médias são coincidentes;

H₀₃: os perfis das médias são constantes ao longo dos seguimentos.

Quando estas hipóteses mostraram significância estatística, prosseguiu-se a análise para discriminar as diferenças. O nível de significância utilizado foi de 0,05.

RESULTADOS

1. Com 6 semanas:

Sinais histológicos de regeneração nervosa foram observados em todos os grupos. Entretanto, diferenças significativas foram notadas nas características histológicas entre os grupos alógenos e autogênicos. No grupo de enxerto autogênico (Figura 1), as fibras mielinizadas eram observadas tendo padrão de distribuição por todo o tecido neural. Em oposição, no grupo de enxerto alógeno, onde menos fibras em regeneração foram observadas, houve um menor grau de mielinização (Figura 2) e a presença de fibras em degeneração no tecido. Nos grupos com imunossupressão (Figura 3), mais fibras mielinizadas foram observadas do que no grupo B.

Quantitativamente foi observado que os valores do índice de densidade de fibras (DF) eram significativamente maiores no grupo C (enxertos com imunossupressão) do que no grupo B (aloenxertos sem imunossupressão), mas não houve diferença significativa quando se comparava com o DF do grupo A. Quando os valores da porcentagem de tecido neural (PTN) eram avaliados, os valores obtidos no grupo C eram significativamente maiores do que no grupo B. Estes valores eram significativamente menores que os valores observados no grupo A (Tabela 2).

Grupo	Enxerto de Nervo	Injeção	Sacrifício
A (n=10)	Lew X Lew (grupo controle autogênico)	Solução salina	6 semanas (n=5)
B (n=10)	Lew X BN (grupo alógeno controle)	Solução salina	6 semanas (n=5) 12 semanas (n=5)
C (n=10)	Lew X BN (grupo com tratamento)	Ciclosporina	6 semanas (n=5) 12 semanas (n=5)

Tabela 1 - Desenho do experimento

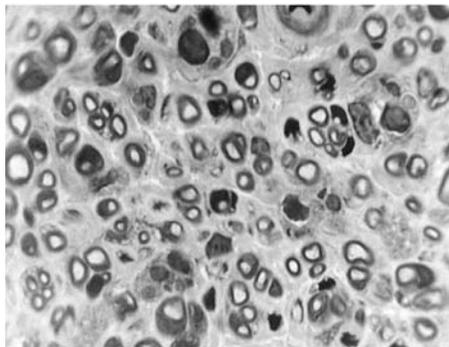


Figura 1 - Enxerto Autógeno com 6 semanas de pós-operatório (aumento de 1000 vezes)

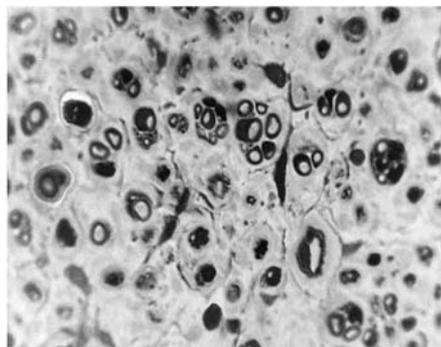


Figura 2 - Enxerto alógeno sem imunossupressão com 6 semanas de pós-operatório (aumento de 1000 vezes)

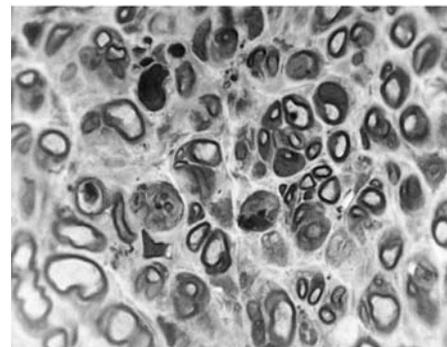


Figura 3 - Enxerto alógeno com imunossupressão com 6 semanas de pós operatório (aumento de 1000 vezes)

2. Com 12 semanas:

A densidade das fibras (DF), no grupo A foi maior do que a observada nos outros 2 grupos. Não houve diferença observada entre os grupos B e C (Tabela 2). Com relação aos valores de porcentagem de tecido neural (PTN), obteve-se um valor superior no grupo A em comparação aos grupos B e C. Não houve diferença entre os grupos B e C (Tabela 3).

Não foram observadas diferenças nos valores da área média das fibras (AMF) entre os 3 grupos seja nos animais sacrificados após 6 ou às 12 semanas de pós-operatório (Tabela 4).

DISCUSSÃO

A análise e a interpretação dos resultados obtidos com enxertos de nervo alógenos são ainda controversos em virtude do estado incerto da histocompatibilidade do doador e do receptor, das diferentes técnicas de enxertia e da complexidade de métodos quantitativos para a avaliação da regeneração neural. Mackinnon et al.⁽¹⁵⁾ propôs um modelo experimental para o estudo da regeneração neural com enxertos alógenos em ratos, aplicando um método computadorizado para a análise dos resultados.

No presente estudo, foram utilizadas espécies de rato com conhecida disparidade na histocompatibilidade⁽¹⁶⁾, e doses adequadas de ciclosporina^(6,18). A morfometria convencional foi utilizada como alternativa válida para o método computadorizado⁽¹⁹⁾.

A utilização de aparato eletrônico para a análises morfométricas não foi ainda alvo de estudos críticos de suas aplicações e principalmente, de suas limitações⁽¹⁹⁾.

A modificação da imagem é um aspecto que pode induzir ao erro quando a análise computadorizada é utilizada. Para o estudo de tecidos como o nervo periférico, existe a necessidade de edição da imagem para a melhora da detecção dos dados, introduzindo-se com isso possibilidade de distorções. Por vezes, torna-se difícil garantir que o achado encontrado no monitor do computador representa com acurácia sua contraparte observada através do mi-

DF		Grupo A	Grupo B	Grupo C
6 semanas	Média	8.3	3.1	5.8
	Desvio- Padrão	1.9	0.8	2.6
		N=5	N=5	N=5
12 semanas	Média	15.3	11.4	12.1
	Desvio- Padrão	2.7	2.4	2.1
		N=5	N=5	N=5

Nível de significância* = 0.05

6 semanas: AXBXC (p=0.0004)*

AXB (p=0.0010)*

AXC (p=0.0926)

BXC (p=0.0409)*

12 semanas: AXBXC (p=0.0224)*

AXB (p=0.0097)*

AXC (p=0.0313)*

BXC (p=0.6070)

Tabela 2 - Densidade de fibras- DF (10^3 fibras/ μm^2)

	PTN	Grupo A	Grupo B	Grupo C
6 semanas	Média	29.6	9.2	20.8
	Desvio- Padrão	6.11	2.17	7.69
		N=5	N=5	N=5
12 semanas	Média	51.4	36	38.2
	Desvio- Padrão	6.47	4.06	1.79
		N=5	N=5	N=5

Nível de Significância* = 0.05

6 semanas: AXBXC (p<0.0001)*

AXB (p<0.0001)*

AXC (p=0.0133)*

BXC (p=0.0017)*

12 semanas: AXBXC (p=0.0001)*

AXB (p<0.0001)*

AXC (p=0.0005)*

BXC (p=0.5105)

Tabela 3 - Porcentagem de Tecido Neural(PTN)

	AMF	Grupo A	Grupo B	Grupo C
6 semanas	Média	36.45	31.21	37.18
	Desvio- Padrão	5.2	3.82	4.78
		N=5	N=5	N=5
12 semanas	Média	34.3	32.38	32.2
	Desvio- Padrão	4.95	4.63	5.57
		N=5	N=5	N=5

Nível de Significância* = 0.05

6 semanas: AXBXC (p=0.8719)

12 semanas: AXBXC (p=0.8719)

Tabela 4 - Área Média da Fibras- AMF (μm^2)

croscópio. De fato, algumas das técnicas massivamente utilizadas em pesquisa baseadas em achados morfológicos têm aplicação prática limitada na anatomia patológica diagnóstica⁽²⁰⁾.

A técnica morfométrica computadorizada não oferece vantagem prática sobre a contagem convencional^(19,20), ambas sendo métodos trabalhosos. O retículo é o método mais primitivo de aquisição de imagens, mas pode produzir resultados precisos e reprodutíveis⁽²¹⁾.

No presente estudo, a técnica de contagem de pontos^(17,22) foi considerada confiável e reprodutível. Sua validação experimental pode ser demonstrada pelo fato de que os dados obtidos neste estudo são similares aos obtidos por Berger et al., que utilizou técnicas morfométricas computadorizadas⁽²³⁾.

A utilização da ciclosporina associou-se a aumento significativo na densidade de fibras e na percentagem de tecido neural no segmento distal dos nervos reconstruídos em animais imunossuprimidos após 6 semanas de pós-operatório, quando comparados com o grupo não imunossuprimido. Com doze semanas, esta diferença não era mais significativa, como também observado por Berger et al⁽²³⁾.

A utilização da ciclosporina parece acelerar o processo de regeneração neural apenas no período inicial (6 semanas de pós-operatório). O processo de rejeição observado no grupo B(aloenxertos sem imunossupressão) pode ter sido interrompido devido à eliminação das células de Schwann do enxerto após 6 semanas. As células de

Schwann são possivelmente o elemento responsável pela rejeição nos nervos periféricos. O enxerto rejeitado no entanto pode servir como um substituto neural acelular, tendo em vista que não há prejuízo maior à sua arquitetura estrutural de tecido conectivo.

Com 12 semanas de pós-operatório, as fibras em regeneração no grupo sem imunossupressão mostraram velocidade de crescimento normal, semelhantes a do grupo imunossuprimido. Isto deveu-se provavelmente à regeneração promovida pelas células de Schwann do hospedeiro que invadiram o enxerto. A migração de células de Schwann pode ser demonstrada pela resposta de rejeição induzida que ocorre nos segmentos de nervo implantados de volta nos seus animais doadores originais⁽²³⁾.

O crescimento mais rápido das fibras neurais em direção a seus órgãos alvo pode resultar em recuperação funcional mais rápida e efetiva. Na prática clínica, os resultados funcionais observados após a enxertia do nervo periférico dependem da extensão do defeito de nervo e de seu respectivo enxerto, do tempo entre a lesão e o reparo e da qualidade da reabilitação funcional; e estas condições não podem ser simuladas em modelo experimental. Está claro que os resultados histológicos de regeneração neural não correspondem ao grau de recuperação funcional.

O modelo experimental apresentado é reprodutível para o estudo de enxertia alógena de nervos e o método morfométrico de contagem de pontos pode ser utilizado para o estudo da regeneração neural de maneira efetiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. White DJG, Calne RY. The use of Cyclosporin A immunosuppression in organ grafting. *Immunological Rev.* 1982; 65: 115-31.
2. Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Falk JÁ, Hunter DA. The peripheral nerve allograft: An assesment of regeneration across nerve allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A. *Plast Reconstr Surg.* 1988; 82:1052-66.
3. Black KS, Hewitt CW, Fraser LA. Cosmas amd Damian in the laboratory. *New Engl J Med.* 1982; 306:368-9.
4. Gulati AK, Zalewski AA. Muscle allograft survival after Cyclosporin A immunosuppression. *Exp Neurol.* 1982; 77:378-85.
5. Zalewski AA, Gulati AK. Survival of Nerve and Schwann cells in allografts after Cyclosporin A treatment. *Exp Neurol.* 1980; 70:219-25.
6. Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Falk JÁ, Hunter DA. The peripheral nerve allograft: A dose- response curve in the rat immunosuppressed with Cyclosporin A. *Plast Reconstr Surg.* 1988; 82:447-57.
7. Wang MS, Roytta M, Gold BG. Comparative dose-dependence study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat aciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 282:1084-93
8. Taskinen HS, Roytta M. Cyclosporin A affects axons and macrophages during Wallerian degeneration. *J Neurotrauma.* 2000; 17:431-40.
9. Meirer R, Babuccu O, Ursal M, Nair DR, Gurunluoglu R, Skugor B, et al. Effect of chronic cyclosporin administration on peripheral nerve regeneration: a dose-response study. *Ann Plast Surg.* 2002; 49:660-7.
10. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical Outcome following Nerve Allograft Transplantation. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 107:1419-29.
11. Doolabh VB, Mackinnon SE. FK506 accelerates functional recovery following nerve grafting in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103:1928-36.
12. Fansa H, Keilhoff G, Altmann S, Plogmeier K, Wolf G, Schneider W. The effect of the immunosupressant FK506 on peripheral nerve regeneration following nerve grafting. *J Hand Surg [Br].* 1999; 24:38-42.
13. Hayashi Y, Shumsky JS, Connors T, Otsuka T, Fischer I, Tessler A, et al. Immunosuppression with either cyclosporine a or FK506 supports survival of transplanted fibroblasts and promotes growth of host axons into the transplant after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2005; 22: 1267-81
14. Schprf J, Strome M, Siemionow M. Immunomodulation with anti-alphabeta T-cell receptor monoclonal antibodies in combination with cyclosporine A improves regeneration in nerve allografts. *Microsurgery.* 2006; 26:599-607
15. Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Hunter DA. The nerve allograft response- An experimental model in the rat. *Ann Plast Surg.* 1985; 14 : 334-9.
16. Palm J, Black G. Interrelationships of inbred rat strains with respect to Ag-B and non-Ag-B antigens. *Transplantation.* 1971; 11:184-9.
17. Gundersen HJG, Bendtsen LK, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyergaard JR, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96:379-94.
18. Wassef R, Cohen Z, Langer B. Pharmacokinetic profiles of Cyclosporine in rats- Influence of route of administration and dosage. *Transplantation.* 1985; 40:489-93.
19. Gil J, Marchevsky A M, Silage DA. Applications of computerized interactive morphometry in pathology: I. Tracings and generation of graphic standards. *Lab Invest.* 1986; 54:222-7.
20. Marchevsky AM, Gil J. Applications of computerized interactive morphometry in pathology: II. A model for computer generated diagnosis. *Lab Invest.* 1986; 54:708-16.
21. Hollinger JO, Buck D, Schmitz JP. Quantitative light microscopy. *Clin Plast Surg.* 1994; 21:463-75.
22. Weibel ER, Staubli W, Anagi HR, Hess FA. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell: Morphometric model, stereologic model, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol.* 1969; 42:68-91.
23. Berger A, Lassner F, Schaller E. Experimental nerve allografting. *Worldplast.* 1996; 1:330-9.