

TUBO DE ÁCIDO POLIGLICÓLICO E GM1 NA REGENERAÇÃO DE NERVOS PERIFÉRICOS

POLYGLYCOLIC ACID TUBE ASSOCIATED WITH GM1 IN REGENERATION OF PERIPHERAL NERVES

MÁRCIO PAULINO COSTA¹, ARMANDO DOS SANTOS CUNHA¹, CIRO FERREIRA DA SILVA², TARCÍSIO ELOY PESSOA DE BARROS FILHO¹, HELOISA JULIANA ZABEU ROSSI COSTA¹, MARCUS CASTRO FERREIRA¹

RESUMO

Introdução: A auto-enxertia de nervo é considerada tratamento de escolha nas grandes perdas de tecido neural que não permitam a reparação através de anastomose primária. Nesses casos, o tubo sintético à base de ácido poliglicólico é uma alternativa para enxertia de nervo. Por outro lado, muitos estudos têm enfatizado a importância dos fatores neurotróficos na regeneração neural: o monossialotetraesossilgângliosídeo (GM1), um dos principais glicosíngolípides do tecido nervoso de mamíferos, é tido como potencializador dos efeitos desses fatores. **Objetivo:** Comparar, em ratos, o grau de regeneração neural, utilizando análise histológica, contagem do número de axônios mielinizados regenerados e análise funcional com a utilização do neurotubo e do GM1. **Métodos:** Essa avaliação foi obtida com a interposição de enxerto autólogo (grupo A), tubo de ácido poliglicólico (grupo B) e da associação do tubo de ácido poliglicólico à administração de GM1 (grupo C) em defeitos de 5 mm no nervo ciático. **Resultados:** Foi observada formação de neuroma apenas no grupo A. Os grupos A e C apresentaram padrões histológicos semelhantes, exceto que os axônios regenerados do grupo C apresentavam-se mais organizados e mielinizados que o grupo A. **Conclusão:** Na recuperação funcional, não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, a despeito das diferenças histológicas qualitativas e quantitativas verificadas.

Descritores: Nervos periféricos/cirurgia. Regeneração nervosa. Ácido poliglicólico/ uso terapêutico. Imunossuppressores/uso terapêutico.

Citação: Costa MP, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TEP, Costa HJZR, Ferreira MC. Tubo de ácido poliglicólico e GM1 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2009; 17(5):286-90. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Traumas e ressecções tumorais resultam frequentemente em grandes perdas de tecido neural periférico, impedindo a reparação através de anastomose primária. Nesses casos, a auto-enxertia de nervo tem sido o método de reparo mais empregado e, a despeito de um tratamento cirúrgico adequado, déficits funcionais são observados.¹ A interposição de condutores tubulares como ponte entre os cotos do nervo seccionado apresenta-se como uma técnica alternativa que oferece vantagens: proporciona melhor confinamento das fibras em regeneração, redução da reação inflamatória e da formação de tecido cicatricial no local de reparo; além disso, evita as sequelas associadas à utilização de material autólogo.¹ Estudos recentes estabeleceram o tubo sintético à base de ácido

ABSTRACT

Introduction: Nerve allografting is regarded as a treatment of choice in large neural tissue losses preventing repair by primary anastomosis. In these cases, a synthetic polyglycolic acid tube is an alternative for nerve grafting. On the other hand, several studies have emphasized the importance of neurotrophic factors on neural regeneration, including substances with potential to optimize neural regeneration, especially the GM1, an neurotrophic enhancer factor. **Objective:** to compare, in rats, the neural regeneration degree using histological analysis, regenerated myelinated axons count, and functional analysis with the use of neurotube and GM1. **Methods:** This assessment was performed by interposing allograft (group A), polyglycolic acid tube (group B) and polyglycolic acid tube associated to GM1 (group C) on 5-mm sciatic nerve defects. **Results:** Neuroma formation was found only on group A. Groups A and C showed similar histological patterns, except for the regenerated axons on group C, which were shown to be better organized and myelinated than in group A. **Conclusion:** on functional recovery, no statistically significant difference was found for the three groups, despite of qualitative and quantitative histological differences found.

Keywords: Peripheral nerves/surgery. Nerve regeneration. Polyglycolic acid/therapeutic use. Immunosuppressive agents/therapeutic use.

Citation: Costa MP, Cunha AS, Silva CF, Barros Filho TEP, Costa HJZR, Ferreira MC. Polyglycolic acid tube associated with GM1 in regeneration of peripheral nerves. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2009; 17(5):286-90. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

poliglicólico (tAPG), como opção para enxertia de nervo. Por outro lado, muitos estudos têm enfatizado a importância dos fatores neurotróficos na regeneração neural: o monossialotetraesossilgângliosídeo (GM1), um dos principais glicosíngolípides do tecido nervoso de mamíferos, é tido como potencializador dos efeitos desses fatores.² No entanto, pouco tem sido estudado sobre os efeitos da administração local de GM1 na regeneração de nervos periféricos, nem tampouco existe relato da utilização dessa substância associada à prótese neural absorvível na literatura. O objetivo deste trabalho é, através de análise histológica e funcional, comparar o grau de regeneração neural obtido com a interposição de enxerto autólogo, de tAPG e de tAPG com GM1, para a correção de defeitos em nervos ciáticos de ratos.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1 – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

2 – ICB- Instituto de Ciências Básicas da Universidade de São Paulo

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Endereço de correspondência: Rua Gabriel dos Santos, 759 12 andar- Santa Cecília- CEP: 01231-011. São Paulo, SP, Brasil. E-mail: marciopaulino@bol.com.br

Trabalho recebido em 21/05/09 aprovado em 25/07/09

MATERIAL E MÉTODO

Quinze ratos isogênicos da raça Lewis com 8 semanas, peso entre 200g e 300g foram utilizados. Com técnica microcirúrgica, foram criados defeitos de 5mm de extensão em nervo ciático da pata direita. Os animais foram divididos em 3 grupos de cinco animais de acordo com o tratamento empregado.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (5m/kg) injetados intra-peritonealmente. Através de acesso dorsal da pata direita, o nervo ciático foi dissecado e 5mm de segmento de nervo removido. (Figura 1)

No grupo A, o segmento removido foi suturado em sua posição normal com 4 pontos epineurais separados de mononylon 10.0. (Figura 2)

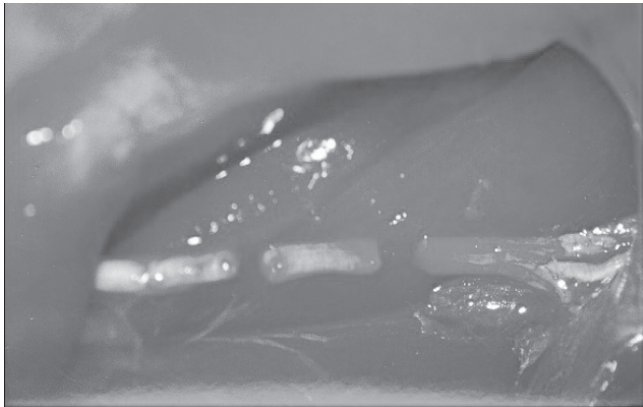


Figura 1 - Ressecção do nervo ciático

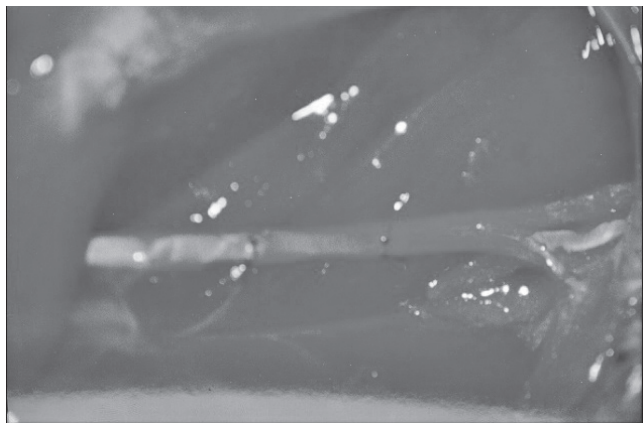


Figura 2 - Grupo A: auto-enxerto

No grupo B, o tubo foi ancorado em sua posição através de 1 ponto em "U", passado em cada extremidade da seguinte maneira: de fora para dentro no tubo, atravessando o epineuro no coto do nervo e voltando ao tubo de dentro para fora, de modo a se deixar cerca de 2,5 mm de extensão do coto inserido. (Figuras 5, 6, 7 e 8) Após uma das extremidades do tubo ser fixada com o ponto, o tubo foi preenchido com solução salina heparinizada (10 unidades por cc). A segunda extremidade foi fixada com a mesma técnica e novamente preenchida com a solução heparinizada (10 unidades por cc). (Figuras 3 e 4)

No grupo C, foi interposto um segmento de tubo com as mesmas características associadas a uma solução de GM1 (Sygen*, distribuído pela TRB PARMA- BRASIL) a uma concentração final de 100 mg/ml por tubo injetadas no interior do tubo e vedadas com gel de vaselina. (Figuras 5 e 6)

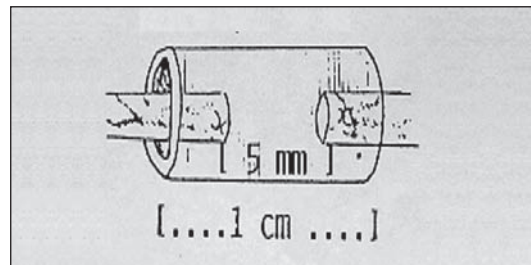


Figura 3 - Grupo B: desenho esquemático tAPG

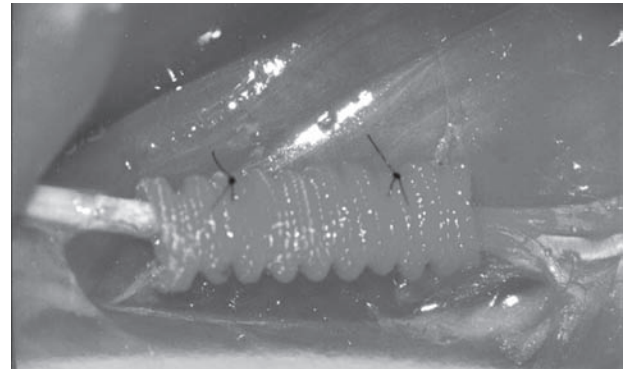


Figura 4 - Grupo B: tAPG



Figura 5 - Grupo C: tAPG + GM1

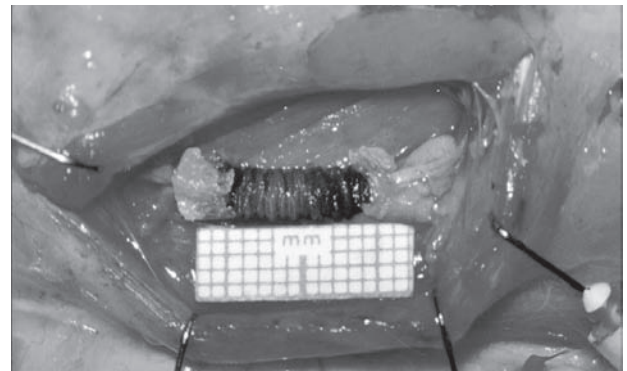


Figura 6 - Grupo C: vedação com gel de vaselina

Os animais receberam água e comida *ad libitum* e sacrificados 6 semanas após a cirurgia para realizar análise histológica e contagem do número de axônios mielinizados regenerados. A avaliação da recuperação funcional foi realizada através da técnica que analisa a impressão das patas posteriores durante uma caminhada ("walking track analysis") no pré e pós-operatório, na terceira semana e no momento do sacrifício (6 semanas).

RESULTADOS

Durante as seis semanas do estudo, todos os animais mantiveram-se saudáveis, não sendo observadas infecção da ferida cirúrgica, nem úlceras plantares neuro-distróficas.

No momento do sacrifício, o Grupo A (auto-enxerto), sob análise macroscópica, demonstrava que os enxertos examinados estavam intactos, com pequenos neuromas ao nível das linhas de sutura.

Nos Grupos B (tAPG) e C (tAPG + GM1), observou-se a presença de uma fina camada de tecido fibroso envolvendo externamente os tubos, que se mostraram praticamente intactos, ainda numa fase inicial do processo de reabsorção. Não foram observados neuromas nestes grupos.

HISTOLOGIA QUALITATIVA

Grupo A (controle, auto-enxerto): a análise microscópica das lâminas mostrou a presença de grande quantidade de fibras com diâmetros variáveis, razoavelmente mielinizadas, dispersas por todo estroma neural, por vezes agrupadas em pequenos fascículos. A reação tecidual em volta do enxerto foi maior se comparada com a dos demais grupos. Foi detectado escape de fibras regeneradas para fora dos limites do epineuro em 3 animais. (Figuras 7 e 8)

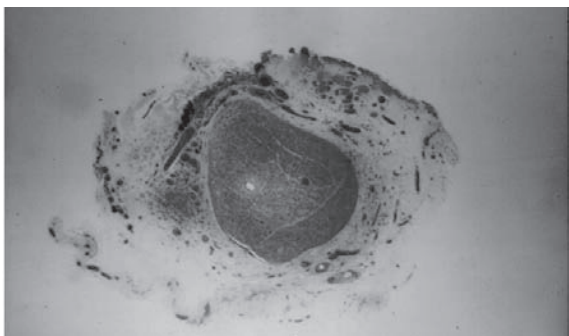


Figura 7 - Grupo A: auto enxerto – reação Tecidual fora do enxerto (40X)

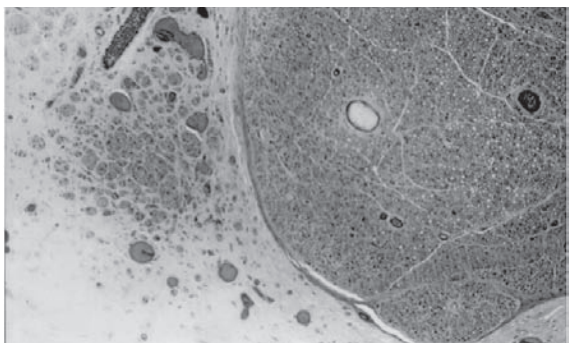


Figura 8 - Grupo A: auto-enxerto- escape (100X)

Grupo B (tAPG): presença de delgado cordão de tecido conjuntivo frouxo, com padrão de estroma neural, com neoangiogênese satisfatória, porém, com menor número de fibras dispersas e pouco mielinizadas de diâmetro menor. (Figuras 9 e 10) Foi detectada a presença de várias células gigantes multinucleadas, com pedaços de tubo no citoplasma indicando início do processo de reabsorção. A reação de fibrose ao redor dos tubos foi claramente menor se comparada com a do Grupo A (auto-enxerto). Não foram observados escapes.

Grupo C (tAPG + GM1): no interior dos tubos, fibroblastos dispostos concêntricamente na periferia delimitavam uma área de tecido conjuntivo frouxo tomando quase todo o espaço intra-luminal, com o processo de neoangiogênese mais intenso que nos grupos anteriores. Numa porção mais central desse estroma néo-formado, notava-se a concentração de um bom número de fibras nervosas de médio cali-

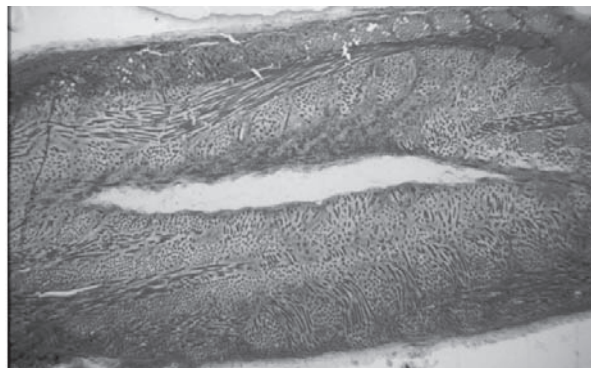


Figura 9 - Grupo B: tAPG NO interior

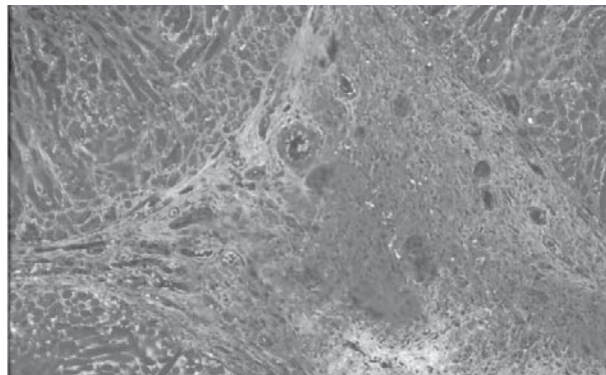


Figura 10 - Grupo B: fibras mielinizadas do tubo de diâmetro menor (100X)

bre, medianamente mielinizadas, arranjadas em um padrão fascicular. De um modo geral, a área ocupada pelas fibras regeneradas nesse grupo foi menor que aquela visualizada no grupo controle, maior que no grupo B (tAPG), porém, com maior concentração de fibras no espaço e maior grau de mielinização. (Figuras 11 e 12) Foi observada

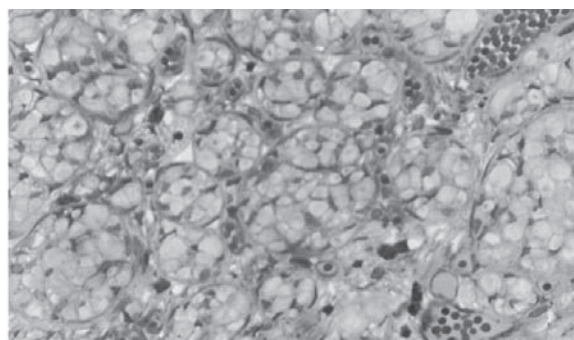


Figura 11 - Grupo C: tAPG+ GM1: padrão faz-quantidade circular (400X)

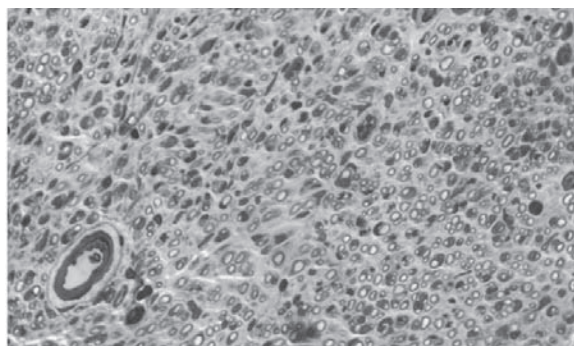


Figura 12 - Grupo C: tAPG + GM1: maior de fibras mielinizadas (400X)

uma delgada camada de tecido fibroso envolvendo os tubos, menor se comparada a do grupo A (auto-enxerto) e semelhante ao grupo B. Não foram observados escapes de fibras para fora do tubo.

ESTUDOS FUNCIONAIS

A figura 13 mostra o aspecto das pegadas dos ratos no pré e pós-operatório dos 3 grupos.

Os valores médios dos IFC (índice de função ciática) calculados para cada grupo estão na Figura 14.

O valor médio do índice de função ciática para cada grupo no pré-

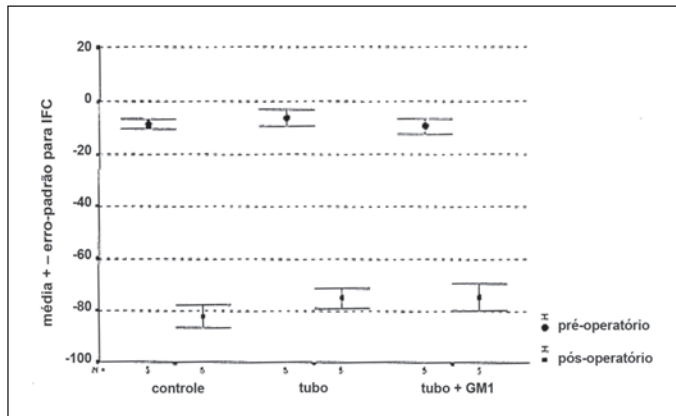


Figura 14 - IFC médio calculado para cada grupo

operatório foi: Grupo A (auto-enxerto) -8.4 ± 4.38 , Grupo B (tAPG) 6.34 ± 7 e Grupo C (tAPG+GM1) -9.47 ± 6.34 . Não se observou diferença significativa entre os grupos.

Em relação ao valor médio do índice de função ciática para cada grupo no pós-operatório, detectou-se: Grupo A (auto-enxerto) -82.12 ± 9.77 , Grupo B (tAPG) -75.19 ± 8.07 e Grupo C (tAPG+GM1) -74.71 ± 11.19 .

As médias da variação do índice de função ciática após 6 semanas da cirurgia estão sumarizadas na Figura 15.

Na análise estatística (Teste de Kruskal- Wallis, com $p < 0,05$), em média, não foi detectada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os 3 grupos em relação aos valores de IFC apresentados no pós-operatório, se comparados aos valores basais normais do pré-operatório. (Figura 15)

DISCUSSÃO

Nos casos de lesões de nervos periféricos com perda de substância, onde a extensão do defeito impede a reaproximação direta dos cotos, o melhor método de reparo parece ser a auto-enxertia.¹

No entanto, existem fatores que nos levam a procurar um novo tipo de condutor para o crescimento axonal: 1. a retirada de material autólogo para enxertia sempre produz morbidade da área doadora;

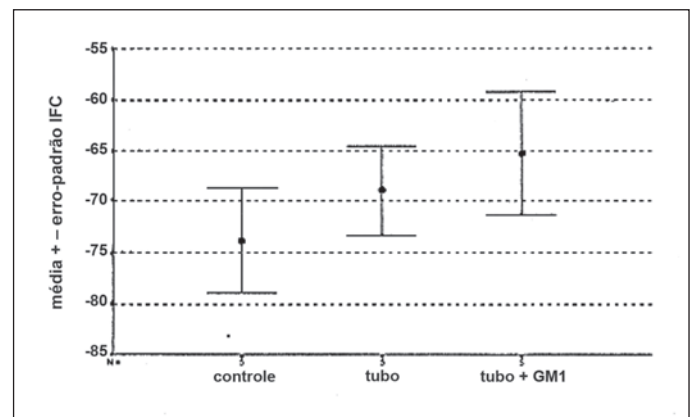


Figura 15 - Médias da variação do IFC após 6 semanas

2. grandes defeitos demandam a retirada de extensas porções de tecido autólogo; 3. a utilização de materiais artificiais poupa o tempo da retirada de material autólogo.^{1,3}

A interposição de condutores tubulares como ponte entre os cotos do nervo seccionado, tem apresentado resultados experimentais e clínicos animadores. Na correção de pequenos defeitos, onde a distância entre os cotos não é grande o suficiente a ponto de atrapalhar a atração quimiotática e quimiotrófica exercida pelo coto distal sobre o cone de crescimento axonal, os resultados são comparáveis aos obtidos com autoenxertos.¹⁻⁷

A técnica de tubulização oferece ainda vantagens teóricas adicionais sobre os métodos tradicionais de enxertia: proporciona boa coaptação dos dois cotos, com menor trauma de manipulação; possibilita melhor confinamento das fibras em crescimento dentro do tubo, isolando o local de reparo da reação inflamatória circundante; orienta o crescimento das fibras em direção ao coto distal, possibilitando a concentração de fatores neurotróficos locais; reduz a formação de neuromas e o escape de fibras para fora do condutor; permite a veiculação de substâncias potencializadoras da regeneração.^{5,6} Muitos materiais têm sido utilizados para elaboração dos tubos, podendo ser absorvíveis⁸ ou não absorvíveis.¹

Vários estudos recentes estabeleceram o ácido poliglicólico (APG), na qualidade de material artificial absorvível de uso clínico, como alternativa para enxertia de nervo.⁷ Os tubos sintéticos compostos de materiais absorvíveis têm mostrado melhores resultados funcionais tardios, quando em comparação aos tubos de material não absorvível.¹ Uma vez que são bio-toleráveis, despertam menor reação de fibrose e, após sua reabsorção, não impedem que o nervo em regeneração cresça em diâmetro¹, ao contrário do que ocorre com os condutores não-absorvíveis.

O sucesso do processo de reparação de um nervo periférico seccionado também depende da existência de um "micro-ambiente" propício à regeneração.⁹ Esse substrato neural fundamental está presente localmente no momento da lesão do nervo e é composto

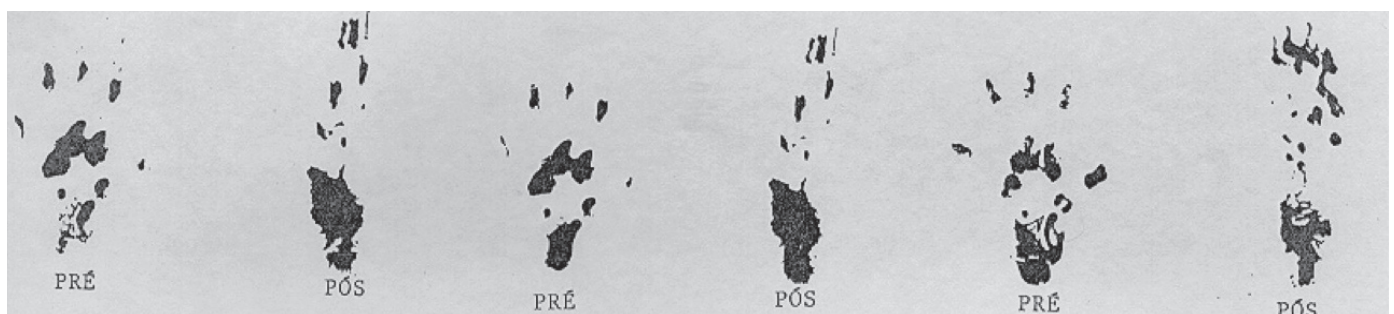


Figura 13 - Aspecto das pegadas dos ratos no pré e pós-operatório dos 3 grupos.

de fatores tais como células de Schwann, fibroblastos perineurais¹⁰, componentes da matriz extra-celular (laminina, fibronectina, moléculas de adesão)^{1,11} e moléculas produzidas pelas extremidades do nervo seccionado estimuladoras da regeneração¹², os chamados fatores neurotróficos.

O monossialogangliosídeo GM1 é um dos principais glicoesfingolípídeos do tecido nervoso de mamíferos, constituindo a maior subclasse de gangliosídeos cerebrais com efeitos sobre os processos de diferenciação e reparo neural, atuando sobre o brotamento e crescimento de neuritos *in vivo* e *in vitro*.¹³⁻¹⁸

O GM1 administrado exogenamente é incorporado às membranas neuronais e teria uma ação potencializadora sobre os fatores neurotróficos.¹³⁻¹⁸ Estudos recentes têm demonstrado sua eficácia no auxílio da recuperação funcional em casos de neuropatia periférica diabética, AVC e trauma raquimedular agudo em homens e animais.¹³⁻¹⁸

Estudos anteriores mostraram evidências de que a administração local de gangliosídeos no local de reparo da lesão de nervo periférico produz um aumento do número de fibras mielinizadas regeneradas.¹³⁻¹⁸ Sua ação se daria preferencialmente sobre a regeneração de fibras motoras, uma vez que tem sido demonstrado que o GM1 responde por cerca de 15% de todos os gangliosídeos na mielina de nervo motor, em contraste com responder por menos de 5% da mielina em nervos sensitivos.¹³⁻¹⁸

O rato, como animal do modelo experimental, é frequentemente utilizado na literatura^{1,19}, sendo considerado clássico no estudo de nervos periféricos. Além deste fato, permite a análise da recuperação funcional de nervo ciático lesado, realizada através do "walking track", metodologia estabelecida por De Medinacelli e modificada por Bain et al.¹⁹, através do padrão da impressão das pedadas destes animais.

O nervo ciático foi utilizado para se criar o modelo de lesão de nervo periférico uma vez que pode ser analisado seu padrão de recuperação funcional¹⁹, fato este importante para se comparar a melhor técnica quando se repara defeito de tecido neural.

A técnica cirúrgica utilizada para a abordagem do nervo ciático, auto-enxertia e colocação do tubo de ácido poliglicólico é a mesma utilizada por diversos autores na literatura^{3,9}, assim como o padrão do tamanho do "gap" utilizado.³

A técnica de preparo dos cortes histológicos que utiliza fixação com tetróxido de ósmio e coloração com azul de toluidina é a que melhor preserva a bainha de mielina, sendo de uso consagrado para estudo dos nervos periféricos.^{1,20}

Em termos macroscópicos, a formação de neuroma foi observada apenas nos ratos submetidos a auto-enxertia. Este dado também foi observado em estudo anterior na literatura.²⁰

REFERÊNCIAS

- Costa MP, Cunha AS, Da Silva CF, Barros Filho TE, Ferreira MC. A utilização do tubo de ácido poliglicólico e FK506 na regeneração de nervos periféricos. *Acta Ortop Bras.* 2006;14:25-9.
- Cuello AC, Garofalo L, Kenigsberg RL, Masinger D. Gangliosides potentiate *in vivo* and *in vitro* effects of nerve growth factor on central cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:2056-60.
- Keeley RD, Nguyen KD, Stephanides MJ, Padilla J, Rosen JM. The artificial nerve graft: a comparison of blended elastomer-hydrogel with polyglycolic acid conduits. *J Reconstr Microsurg.* 1991;7:93-100.
- Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ, McGill KC, Abraham G. A comparison of suture and tubulization nerve repair technique in a primate. *J Hand Surg Am.* 1991;16:251-61.
- Millesi H, Berger A, Meissl G. Experimentelle Untersuchungen zur heilung durchtrennter peripherer nerven. *Eur J Plastic Surg.* 1972;1:174-206.
- Pham HN, Padilla JA, Nguyen KD, Rosen JM. Comparison of nerve repair techniques: suture vs vitene-polyglycolic acid tube. *J Reconstr Microsurg.* 1991;7:31-6.
- Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg.* 1988;82:849.
- Madison R, Da Silva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin containing gel. *Exp Neurol.* 1985;76:767-72.
- Fields RD, Lebeau JM, Longo FM, Ellisman HH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog Neurobiol.* 1989; 33:87-134.
- Politis MJ, Ecerle K, Spencer PS. Tropism in nerve regeneration *in vivo*, attraction

of regenerating axons by diffusable factors derived from cells in distal nerve stump of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982;253:1-12.

of regenerating axons by diffusable factors derived from cells in distal nerve stump of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982;253:1-12.

of regenerating axons by diffusable factors derived from cells in distal nerve stump of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982;253:1-12.

of regenerating axons by diffusable factors derived from cells in distal nerve stump of transected peripheral nerves. *Brain Res.* 1982;253:1-12.

CONCLUSÕES

- Os grupos apresentaram padrões histológicos diferentes. O que utilizou a auto-enxertia (controle) apresentou uma maior reação tecidual se comparada aos demais, além da presença de escape de fibras, fenômeno não observado nos outros grupos. A área ocupada pelas fibras regeneradas do grupo C (tAPG+GM1) foi menor que a do controle, maior que a do grupo B (tAPG), porém, com uma maior concentração de fibras no espaço e maior grau de mielinação.
- Os grupos não apresentaram diferenças significativas quanto à recuperação funcional.