

Células-Tronco: Uma Nova Esperança na Regeneração Neural?

Raquel Salomone

“A regeneração é um fenômeno básico da vida e o tecido nervoso não é uma exceção”

Há muitos séculos os homens tentam, sem sucesso, uma regeneração satisfatória do sistema nervoso¹. Em 200 a.C, Galeno retratava a primeira tentativa de regeneração de um nervo lesado². Em 600 d.C, Argino descreveu a primeira neurorrafia² porém somente em 1873, ou seja, mais de um milênio depois, é que Hueter relatou o que chamamos de “algum sucesso” na reparação cirúrgica de um nervo lesado².

Muito se especula sobre os “saltos tecnológicos” que ocorrem durante as guerras e na Medicina. Em se tratando de regeneração neural, esses saltos existem mesmo. Durante a Segunda Grande Guerra do século XX, aproveitando a infinidade de pacientes gerados nos campos de batalha, a pesquisa sobre a recuperação de lesão neural havia alcançado o seu ápice, sobretudo com a divulgação do “*Senior Consultant in Neurologic Surgery to the European Theater of Operations*” em 1942³, no qual estabeleceu-se “uma sutura precoce e sem tensão” como o melhor método de recuperação funcional de um nervo lesado. Contudo, mesmo passados aproximadamente oitenta anos nos quais gastaram-se milhões de

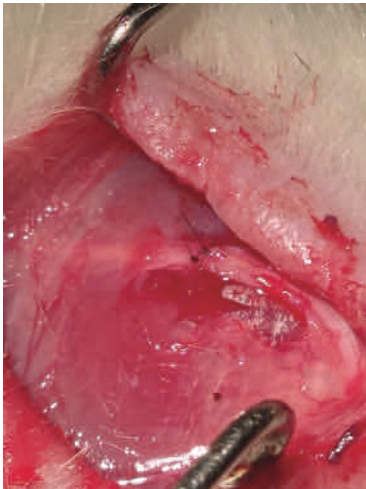


Figura 1. Exemplo de sutura término-terminal no ramo mandibular do nervo facial de rato – Técnica padrão-ouro de reparação neural.

dólares em pesquisas, os resultados funcionais de recuperação de um nervo continuam insatisfatórios⁴⁻⁶ e bem semelhantes aos descritos no século passado³.

Quando um nervo sofre uma neurotme-se, ou seja, uma ruptura total, a recuperação espontânea não é esperada e os melhores resultados funcionais são obtidos com a sutura término-terminal dos cotos (**Figura 1**), método considerado padrão-ouro (*gold standard*) atual de reparação neural⁷⁻¹⁰. No entanto, quando há perda de grande parte de seguimento neural e a técnica término-terminal não pode ser aplicada, pode-se dispor de enxertos, homólogos e/ou heterólogos, para a correção do *gap* formado entre os cotos. Esses enxertos servem tanto como ponte para o crescimento neural, como para sustentação biológica dos cotos axonais, dando substratos químicos para esses cresceu-

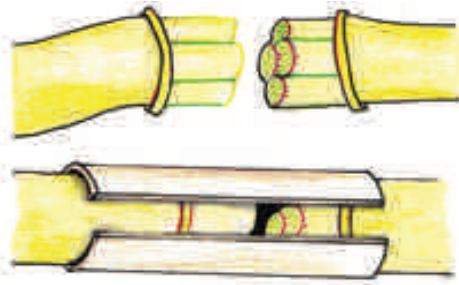


Figura 2. Exemplo de técnica de tubulização

como fascias musculares,¹⁶ no entanto, com o avanço das pesquisas, hoje já é possível a utilização de conduítes sintéticos repletos de fatores de crescimento neurais específicos¹⁷, os quais prolongam a nutrição neural tornando-se verdadeiras “células de suporte”, assemelhando-se bastante as células de Schwann (CS), as quais são as grandes responsáveis pelo sucesso da regeneração dos nervos periféricos²⁻¹⁰⁻¹⁸⁻²⁰.

Como descrito acima, pela importância que as células de Schwann exercem na regeneração do nervo periférico faz com que nos deparemos com um grande problema: a proliferação de CS endógenas, provenientes dos segmentos axônais, é insuficiente para suprir a demanda necessária no processo de regeneração neural, tornando importante uma complementação exógena¹⁹⁻²¹. Com esse objetivo, de suprir esta demanda, diversas fontes alternativas de CS têm sido estudadas, sendo as células-tronco a mais promissora das promessas²².

Células-tronco. Células-tronco são células que possuem as capacidades de auto-replicação e diferenciação, ou seja, podem gerar outras células-tronco além de diferenciar-se em qualquer outro tipo de célula (**Figura 3**)²³⁻²⁴. De modo dife-

rem e se degenerarem⁸⁻¹¹. Contudo, a utilização desses enxertos implicam na necessidade de imunossupressão¹² (enxertos heterólogos) e sequelas neurais da área doadora¹³ (enxertos homólogos). Observando esses fatos, surgiram técnicas de reparação neural utilizando uma forma de conduítes, chamados de tubulização (**Figura 2**)¹⁴⁻¹⁵. Primeiramente esses conduítes eram feitos de materiais homólogos

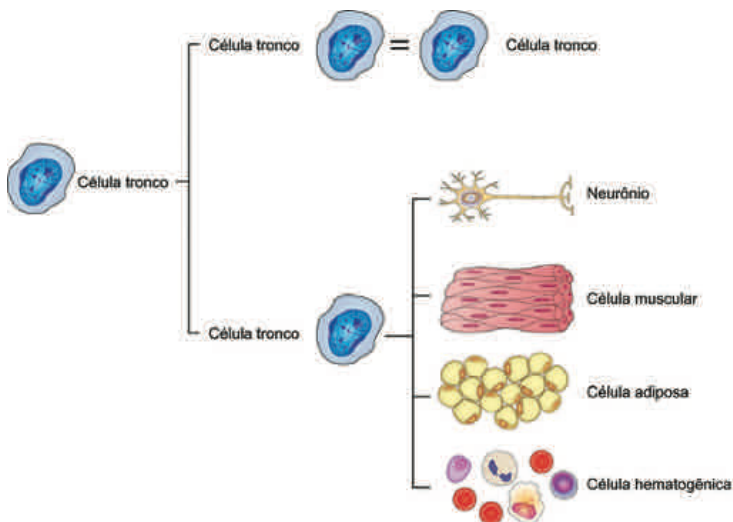


Figura 3. Características das células tronco.

rente do que se pensa, as células-tronco podem ser encontradas em qualquer tecido do corpo humano, no entanto, alguns tecidos como o hematopoiético e conjuntivo adiposo possuem um número maior de células-tronco do que tecidos mais especializados como o tecido nervoso²⁻²⁵. Hoje são descritos 3 tipos de células-tronco: as células-tronco embrionárias que também são chamadas de células pluripotentes, pois possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula adulta, as células-tronco adultas também conhecidas como multipotentes pois possuem uma capacidade um pouco menor de diferenciação que as células embrionárias e as células tronco pluripotentes induzidas, as quais são células adultas reprogramadas a partir da modificação de seu DNA por um vetor viral²⁵ (**Figura 4**).

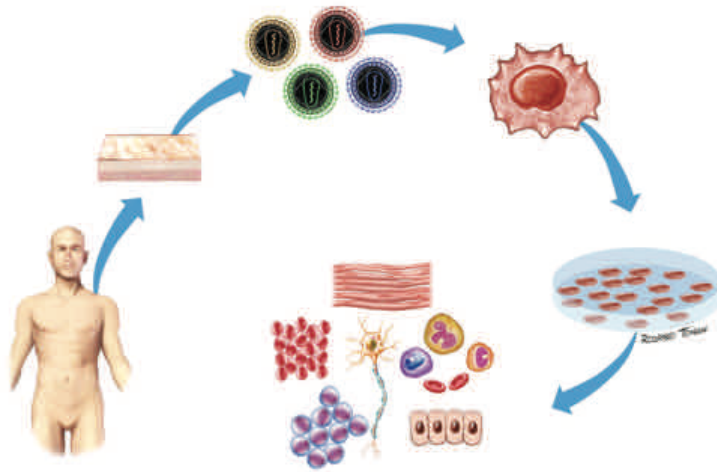


Figura 4. A figura mostra como a reprogramação das células da pele é feita por meio da inserção de vetores virais. A célula adulta normal é infectada com o vírus que transporta 4 genes; oct-4, sox-2, 4-klf e c-Myc. Estas células “retornam” às condições de células-tronco, para depois serem capazes de duplicá-las e diferenciá-las em outros tecidos.

Fontes distintas de células-tronco têm sido utilizadas em pesquisas de regeneração neural como: células-tronco do folículo capilar²⁶, células-tronco derivadas do tecido adiposo²⁷, células-tronco da crista neural²⁸, células-tronco embrionárias²⁹, células-tronco de polpa dentária³⁰ entre outras. Cada uma apresentando suas vantagens e desvantagens. No entanto uma das mais estudadas são as células do estroma da medula óssea. Essas células são sabidamente células-tronco multipotentes³¹⁻³³ e satisfazem os requisitos para um transplante ideal de células: fácil acesso, rápida expansão *in vitro* e imunogenicidade baixa³³⁻³⁴. Além disso, quando devidamente cultivadas, as células-tronco mesenquimais, cuja denominação correta é células multipotentes do estroma mesenquimal², possuem a capacidade de se diferenciar em células de várias linhagens, inclusive ectodérmica, e expressar os fenótipos de CS e de células da glia, tornando-se uma das mais promissoras alternativas no tratamento de lesões do sistema nervoso^{32,35-37}.

Células-tronco na regeneração neural. Desde a primeira apresentação formal em 1978³⁸, sobre a utilização de células-tronco, o tratamento de doenças

com esta abordagem vem crescendo exponencialmente. É importante ressaltar que com o surgimento de uma legislação impositiva sobre o uso de células-tronco, poucos estudos em humanos foram publicados na última década. No entanto, mais de 4000 estudos envolvendo pacientes e a utilização de células-tronco estão cadastrados como ensaios clínicos³⁹.

Neste exato momento, poucas doenças podem ser realmente tratadas com células-tronco. São exemplos algumas doenças hematopoéticas, como alguns tipos leucemias e anemia falciforme além do tratamento de grandes áreas de queimaduras na pele, por meio de enxerto de pele saudável proveniente da cultura de células-tronco extraídas de pequenos retalhos de pele saudável. No entanto, o avanço das pesquisas nos faz acreditar que, em muito breve, doenças tidas como “incuráveis”, como por exemplo diabetes tipo I⁴⁰, Parkinson⁴¹ e alguns tipos de cegueira⁴² poderão ser curadas.

Em 2004, Mazzini *et al.*⁴³ implantaram células-tronco mesenquimais autólogas na medula espinhal de sete pacientes com esclerose lateral amiotrófica, obtendo resultados positivos: quatro pacientes apresentaram melhora intensa e dois pacientes melhora moderada da força na musculatura proximal dos membros inferiores.

Caylan *et al.* (2006)⁴⁴ publicaram o caso de uma mulher de 20 anos com paralisia facial traumática iatrogênica após um procedimento de mastoidectomia por otite média crônica. Primeiramente os autores repararam o *gap* de 8-10mm do nervo (segmento mastoideo) com enxerto autólogo (nervo auricular magno) imediatamente após a lesão. Após 42 dias, sem melhora clínica e/ou eletro-neurofisiológica (House-Brackmann [HB] VI), a paciente foi submetida a um novo procedimento cirúrgico para a implantação de células-tronco mesenquimais indiferenciadas autólogas, obtendo resultados significativos: em sete dias houve uma melhora de dois graus na escala HB (HB VI para HB IV) além de uma melhora eletro-neurofisiológica com o aparecimento de potenciais polifásicos. Após cinco meses, os autores descreveram que a paciente evoluiu para HB III.

Salomone *et al.* (2012)²⁻³¹ avaliaram a regeneração do nervo facial de ratos após neurotome e implantação de células-tronco indiferenciadas ou células-tronco diferenciadas em CS. **(Figura 5)** Concluíram que os dois tipos de células-tronco estudados beneficiaram a regeneração neural, contudo as células indiferenciadas foram mais eficazes na regeneração neural do que as diferenciadas em CS. Esses resultados divergiram da maioria dos outros publicados, porém são explicados por dois motivos: 1- pelo método objetivo de avaliação funcional⁴⁵ (eletromiografia) utilizado; 2- necessidade maior que as células-tronco diferenciadas em CS têm de um substrato biológico para a sua sobrevivência.

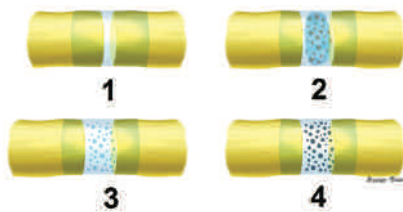


Figura 5. Grupos estudados por Salomone *et al* (2012)^{2,31}. [1] Ambas partes do nervo foram conectadas usando um tubo de silicone vazio. [2] O tubo foi preenchido por um gel acelular. [3] O espaço foi preenchido por células-tronco não diferenciadas. [4] O tubo foi preenchido por células já diferenciadas em células de Schwann.

Yan *et al.* (2004)⁴⁶ usaram células-tronco neurais em condutas compostas por fâscia autóloga para reparar um *gap* de 6mm do nervo facial de coelhos. Seis semanas após o procedimento cirúrgico, eles compararam esse grupo com o grupo no qual foi aplicada somente a fâscia. Os autores relataram melhora na resposta funcional, com diferença significativa nas latências e no crescimento axonal do grupo que utilizou células-tronco.

Guo *et al.* (2006)⁴⁷ avaliaram por imunohistoquímica, eletroneuromiografia e histologia (quantitativa) a regeneração do nervo facial de coelhos, 12 semanas após a implantação de células-tronco neurais extraídas de cobaias e descreveram a diminuição da latência, o aumento da amplitude, o aumento da quantidade e do diâmetro das fibras axonais significativamente maiores no grupo tratado com células-tronco, quando comparados ao grupo tratado apenas com soro fisiológico, concluindo assim que células-tronco neurais de cobaias promoveram a regeneração no nervo facial de coelhos.

Zhang *et al.* (2008)⁴⁸ implantaram células-tronco extraídas do córtex cerebral de ratos, embebidas em uma solução de ácido hialurônico e/ou colágeno dentro de condutas de colágeno, para avaliar a regeneração do nervo facial seccionado de coelhos. Os autores avaliaram os resultados eletrofisiológicos e histológicos após 12 semanas, concluindo que essas células-tronco, facilitaram a reinervação dos axônios lesados. Além disso, os autores citam que não houve rejeição, comprovando a imunogenicidade baixa deste tipo de célula-tronco.

Satar *et al.* (2009)⁴⁹ estudaram a regeneração do ramo bucal de nervos em ratos em contato com *gelfoam*® embebido de células-tronco mesenquimais indiferenciadas, após a transecção e sutura epineural término-terminal imediata. Os autores avaliaram a regeneração neural pelo estudo histológico qualitativo e relataram que o grupo tratado com as células-tronco obtiveram resultados superiores, com melhora na organização axonal e espessura da mielina.

Inúmeros outros estudos têm demonstrado o potencial benefício do uso de células-tronco na regeneração neural, provando SIM, que as células-tronco são uma alternativa real no tratamento de lesões neurais e não mais uma promessa vazia²².

Referências bibliográficas

1. Dong M, Yi T. Stem Cell and Peripheral Nerve Injury and Repair. *Facial Plastic Surgery*. 2010;26(5):421-7.
2. Salomone R. Regeneration of the mandibular branch of rats' facial nerve regeneration after implanting undifferentiated mesenchymal stromal multipotent cells and differentiated Schwann-like cells in vitro [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo";2012.
3. Gluck T. Ueber Transplantation, regeneration und entzündliche Neubildung. *Berl Klin Wochenschr* 1881; 18: 529-31.
4. Lundborg G, Dahlin L, Danielsen N, Zhao Q. Trophism, tropism and specificity in nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*. 1994;10:345-54.
5. Yanagihara N. Transmastoid decompression of the facial nerve in temporal bone fracture. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1982;90:616-21.
6. McKennan KX, Chole RA. Facial paralysis in temporal bone trauma. *Am J Otol*. 1992;13:167-72.
7. Millesi H. Techniques for nerve grafting. *Hand Clin*. 2000;16(1):73-91, VIII.
8. Millesi H. Facial nerve suture. In: Fisch U- Facial nerve surgery. Birmingham: Aesculapius; 1977. p. 209-15.

9. McGovern FH. The return of function after damage to the facial nerve. *Eye Ear Nose Throat Mon.* 1970;49:451-4.
10. May M, Schaitkin BM. The facial nerve. 2nd ed New York: Thieme; 2000.
11. Fields RD, Beau JML, Longo FM, Ellisman MH. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Progress in Neurobiology.* 1989;33:87-134.
12. Chen S, Velardez MO, Warot X, Yu ZX, Miller SJ, Cros D, Corfas G. Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function. *J Neurosci.* 2006a;26:3079-86.
13. Nishiura JB, Nilsson B, Kanje M, Dahlin LB. Addition of cultured Schwann cells to tendon autografts and freeze-thawed muscle grafts improves peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng.* 2004;10:157-64.
14. Doolabh VB, Hertl MC, Mackinnon SE. The role of conduits in nerve repair: a review. *Rev. Neurosci.* 1996;7:47-84.
15. Bento RF, Salomone R, Brito Neto R, Tsuji RK, Hausen M. Partial Lesions of the Intratemporal segment of the facial nerve. Graft or Partial Reconstruction? *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008;117(9):665-9.
16. Weiss P. The technology of nerve regeneration: A review sutureless tabulation and related methods of nerve repair. *J Neurosurg.* 1944;1:400-50.
17. Pabari A, Lloyd-Hughes H, Seifalian AM, Mosahebi A. Nerve conduits for peripheral nerve surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2014 Jun;133(6):1420-30. doi: 10.1097/PRS.0000000000000226.
18. Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *Neurocytol.* 1994;23:1-28.
19. Dezawa M, Mutoh T, Dezawa A, Adachi-Usami E. Putative gap junctional communication between axon and regenerating Schwann cells during mammalian peripheral nerve regeneration. *Neuroscience.* 1998;85:663-7.
20. 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.
21. Sulaiman OA, Gordon T. Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia.* 2000;32:234-46.
22. Keilhoff G, Fansa H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration - A real hope or just an empty promise? *Exp Neurol.* 2011;232:110-3.
23. Oiticica J, Barboza-Junior LC, Batissoco AC, Lezirovitz K, Mingroni-Netto RC, Haddad LA, Bento RF. Retention of progenitor cell phenotype in otospheres from guinea pig and mouse cochlea. *J Transl Med.* 2010 Nov 18;8:119. doi: 10.1186/1479-5876-8-119.
24. Galli D, Vitale M, Vaccarezza M. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cell Differentiation toward Myogenic Lineages: Facts and Perspectives. *Biomed Res Int.* 2014;2014:762695. Epub 2014 Jun 26.
25. National academy of Sciences. Understanding Stem Cells. http://dels.nas.edu/resources/static-assets/materials-based-on-reports/booklets/Understanding_Stem_Cells.pdf
26. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102:17734-8.
27. Sun F, Zhou K, Mi W, Qui J. Repair of facial nerve defects with decellularized artery allografts containing autologous adipose-derived stem cells in a rat model. *Neuroscience Letters.* 2001;499:104-8.
28. Aquino JB, Hjerling-Leffler J, Koltzenburg M, Edlund T, Villar MJ, Erfors O. In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. *Exp. Neurol.* 2006;198:438-49.
29. Lin C, Jun J, Ling W, Xin Z, Fraser JL, Snider BJ, Yu SP. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem Cells.* 2008b;26:1356-65.
30. Kerkis I, Caplan AI. StemCells in Dental Pulpof Deciduous Teeth. *Tissue Eng Part B Rev.* Apr 2012; 18(2): 129-138.
31. Salomone R, Bento RF, Costa HJ, Azzi-Nogueira D, Ovando PC, Da-Silva CF, Zanatta DB, Strauss BE, Haddad LA. Bone marrow stem cells in facial nerve regeneration from isolated stumps. *Muscle Nerve.* 2013 Sep;48(3):423-9. doi: 10.1002/mus.23768. Epub 2013 Jul 3.
32. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;247:71-4.
33. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Mar-shak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.

34. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.* 2006a;36:2566-73.
35. Woodburg D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci.* 2000;61:364-370.
37. Terenghi G, Wiberg M, Kingham PJ. In: *Essays on Peripheral Nerve Repair and Regeneration; Use of Stem Cells for Improving Nerve Regeneration.* 2009 pg.:393 -403.
38. Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res.* 1978;18;25(3):205-7.
39. www.clinicaltrials.gov
40. Chhabra P, Brayman KL. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope. *Stem Cells Transl Med.* 2013 May;2(5):328-36. doi: 10.5966/sctm.2012-0116. Epub 2013 Apr 9.
41. Badger JL, Cordero-Llana O, Hartfield EM, Wade-Martins R. Parkinson's disease in a dish - Using stem cells as a molecular tool. *Neuropharmacology.* 2014 Jan;76 Pt A:88-96. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.035. Epub 2013 Sep 10.
42. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J. Treatment of Severe Ocular-Surface Disorders with Corneal Epithelial Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 1999; 340:1697-1703 June 3, 1999DOI: 10.1056/NEJM199906033402201.
43. Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, Pastore I, Marasso R, Madon E. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2003;4:158-61.
44. Caylan R, Bektas D, Dikmen T, Bektas O, Omay SB, Ovali E. Mesenchymal stem cells in iatrogenic facial nerve paralysis: a possible role in the future. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006;263(10):963-7.
45. Salomone R, Costa HJ, Rodrigues JR, Reis e Silva SM, Orlando PC, Bento RF. Assessment of a neurophysiological model of the mandibular branch of the facial nerve in rats by electromyography. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2012 Mar;121(3):179-84.
46. Yan CJ. Research on repairing facial nerve injury of rabbits by neural stem cells and autologous fascia. *Chinese J Rehabil Theory Practice.* 2004;10:21-2.
47. Guo BF, Dong MM, Ren X. Research of guinea pig neural stem cells promoting facial nerve regeneration in rabbits. *J Zhengzhou Univ (Medical Science).* 2006;41(3):445-8.
48. Zhang H, Wei YT, Tsang KS, Sun CR, Li J, Huang H, Cui FZ, An YH. Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model. *J Transl Med.* 2008;5,6:67.
46. Guo BF, Dong MM. Application of neural stem cells in tissue-engineered artificial nerve. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;140:159-64.
47. Shi Y, Zhou L, Tian J, Wang Y. Transplantation of neural stem cells overexpressing glia-derived neurotrophic factor promotes facial nerve regeneration. *Acta Oto-Laryngologica.* 2009;129:906-14.
49. Satar B, Karahatay S, Kurt B, Ural AU, Safali M, Avcu F, Oztas E, Kucuktag Z. Repair of Transected Facial Nerve With Mesenchymal Stromal Cells: Histopathologic Evidence of Superior Outcome. *Laryngoscope.* 2009;119:2221-5.