



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIEL FERREIRA FERNANDES VIEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CENTRIFUGADO DE MEDULA
ÓSSEA NA CICATRIZAÇÃO DE LESÃO MUSCULAR:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS**

DANIEL FERREIRA FERNANDES VIEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CENTRIFUGADO DE MEDULA
ÓSSEA NA CICATRIZAÇÃO DE LESÃO MUSCULAR:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Dissertação para a obtenção do título de mestre
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina da Universidade Estadual de
Londrina

Área de concentração: Ortopedia e
Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches
Vaz

Londrina
2010

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V658a Vieira, Daniel Ferreira Fernandes.
Avaliação do efeito de centrifugado de medula óssea na cicatrização de lesão
muscular : estudo experimental em coelhos / Daniel Ferreira Fernandes Vieira. –
Londrina, 2010. 52 f. : il.

Orientador: Carlos Eduardo Sanches Vaz.
Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde, 2010.
Inclui bibliografia.

1. Músculos – Ferimentos e lesões – Teses. 2. Músculos – Regeneração
– Teses. 3. Células de medula óssea – Pesquisa experimental – Teses. 4. Coelho
como animal de laboratório – Teses. I. Vaz, Carlos Eduardo Sanches. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 617.3

DANIEL FERREIRA FERNANDES VIEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CENTRIFUGADO DE MEDULA ÓSSEA
NA CICATRIZAÇÃO DE LESÃO MUSCULAR: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Dissertação para a obtenção do título de mestre apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Estadual de Londrina. Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Carlos Eduardo Sanches Vaz
(Presidente)
UEL – Londrina – PR

Professor Dr. Paulo José de Santana (Membro)
UEL – Londrina – PR

Professor Dr. Marco Aurélio de Freitas
Rodrigues (Membro)
UEL – Londrina – PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão deste trabalho e de mais esta etapa de minha formação profissional às pessoas que tornaram este momento possível:

Aos meus amados pais, **Sônia e Flávio**, pelo amor incondicional e educação concedidos durante todos os anos de minha vida, contribuindo para minha formação pessoal e profissional.

À minha amada esposa **Camila**, pelo amor, dedicação e incentivo recebidos durante todos estes anos em que estamos juntos.

Ao meu irmão **Alexandre**, por ser meu verdadeiro e incondicional amigo.

Às minhas queridas avós **Zara e Lázara**, por terem participado e contribuído em minha criação e formação.

Aos meus falecidos e saudosos avôs **Algacyr e Francisco**, grandes incentivadores de minha formação profissional.

À minha família e amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Carlos Eduardo Sanches Vaz**, pelas orientações, ensinamentos, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Paulo José de Santana**, pelo incentivo, amizade e por ter colaborado para o meu ingresso no Programa de Pós-Graduação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Estadual de Londrina, em especial à Prof^a. Dr^a. **Ana Maria Bonametti** e à Prof^a. Dr^a. **Tiemi Matsuo**, pelo esforço, profissionalismo e dedicação ao curso.

A todos os funcionários do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, envolvidos no Programa de Pós-Graduação em Medicina, que de forma direta ou indireta estiveram envolvidos com a realização e a conclusão deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. **Consuelo Junqueira Rodrigues, Alexandre Queiroz Silva** e demais funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela colaboração na análise histológica deste trabalho.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptada do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Norma Brasileira 14724. Informação e documentação - Trabalhos acadêmicos - Apresentação. Segunda edição. 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed for MEDLINE* (2008).

VIEIRA, Daniel Ferreira Fernandes. **Avaliação do efeito de centrifugado de medula óssea na cicatrização de lesão muscular** : estudo experimental em coelhos. 2010. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito positivo de um centrifugado de medula óssea na cicatrização de lesão muscular em coelhos. **MÉTODOS:** Este estudo experimental envolveu a utilização de quinze coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco. Em cada animal, realizou-se uma lesão na região média do músculo tibial anterior direito, onde se adicionou uma esponja de colágeno absorvível, embebida em um centrifugado de aspirado de medula óssea do osso íliaco ipsilateral. O membro posterior esquerdo foi utilizado como controle, sendo submetido à mesma lesão, porém neste caso adicionando-se somente a esponja de colágeno absorvível. O centrifugado de medula óssea foi previamente submetido à contagem do número de células nucleadas e a teste de viabilidade celular. Após trinta dias os animais foram sacrificados para o estudo da cicatrização muscular por meio de histomorfometria, interessando-se a mensuração do número de células musculares em regeneração por micrômetro quadrado e a proporção de fibrose. **RESULTADOS:** O método de centrifugação utilizado neste estudo resultou em uma concentração média de células nucleadas maior que o número destas células nos aspirados originais, sem provocar destruição celular significativa. A utilização do centrifugado de medula óssea na lesão do músculo tibial anterior direito resultou aumento não significativo do número de células musculares em regeneração por micrômetro quadrado em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa da proporção de fibrose em relação ao grupo controle. **CONCLUSÃO:** A administração de centrifugado de medula óssea utilizada neste estudo não favoreceu a cicatrização de lesão muscular em coelhos.

Descritores: 1. Medula óssea 2. Células-tronco 3. Regeneração 4. Músculo esquelético 5. Modelos animais 6. Coelhos.

VIEIRA, Daniel Ferreira Fernandes. **Avaliação do efeito de centrifugado de medula óssea na cicatrização de lesão muscular** : estudo experimental em coelhos. 2010. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The objective of this study was to evaluate the positive effect of a centrifuged of bone marrow on the healing of muscle injury in rabbits. **METHODS:** This experimental study involved the use of fifteen adult male rabbits from New Zealand White strain. In each animal, it was done a lesion in the middle of the right tibialis anterior muscle where it was added an absorbable collagen sponge that had been soaked in a centrifuged of bone marrow aspirate from the ipsilateral iliac bone. The left hind limb was used as control and underwent the same injury, but in this case it was just added the absorbable collagen sponge. The centrifuged of bone marrow was previously submitted to count the number of nucleated cells and cellular viability test. After thirty days the animals were sacrificed to study the muscle healing by histomorphometry; it was interested to measure the number of muscle cells in regeneration by square micrometer and the proportion of fibrosis. **RESULTS:** The centrifugation method used in this study resulted in an average concentration of nucleated cells greater than the number of these cells in original aspirates, without causing significant cellular destruction. Using centrifuged of bone marrow on lesion in the right tibialis anterior muscle resulted in no significant increase in the number of muscle cells in regeneration by square micrometer when it was compared with the control group. There was no significant difference in the proportion of fibrosis in the control group. **CONCLUSION:** The administration of a centrifuged of bone marrow used in this study did not favor the healing of muscle injury in rabbits.

Descriptors: 1.Bone marrow 2.Stem cells 3.Regeneration 4.Skeletal muscle 5.Animals models 6.Rabbits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático da estrutura do músculo esquelético	14
Figura 2 – As diferentes fases da cicatrização muscular após lesão	15
Figura 3 – Lesão da musculatura posterior da coxa.....	24
Figura 4 – Imagem de ultrasonografia da musculatura da parte posterior da coxa.....	25
Figura 5 – Imagem de ressonância magnética da coxa	25
Figura 6 – Resultado da centrifugação do aspirado de medula óssea.....	32
Figura 7 – Via de acesso e exposição do músculo tibial anterior	34
Figura 8 – Ferida lacerante no corpo do músculo tibial anterior.....	34
Figura 9 – Reparo muscular e esponja de gelatina absorvível embebida em centrifugado de medula óssea na lesão do músculo tibial anterior direito	35
Figura 10 – Reparo muscular e esponja de gelatina absorvível na lesão do músculo tibial anterior esquerdo	35
Figura 11 – Pontos de reparo e orientação para a secção.....	37
Figura 12 – Secção transversal mostrando as três regiões da lesão	38
Figura 13 – Visualização de área de regeneração muscular em região intermediária de lesão com microscopia óptica comum.....	39
Figura 14 – Demarcação dos tecidos formados na área de regeneração muscular para análise quantitativa com histomorfometria.....	40

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	por cento
cm	centímetro
mm	milímetro
nm	nanômetro
Kg	quilograma
mg/Kg	miligrama por quilograma
ml	mililitro
g	número de vezes que a aceleração é superior à aceleração gravítica sentida à superfície da Terra
°C	graus centígrados
µl	microlitro
M	molar
®	marca registrada
µm²	micrômetro quadrado
µm	micrômetro
MHz	megahertz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 O MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	13
2.2 A CICATRIZAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	15
2.3 MECANISMOS DE LESÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	21
2.4 DIAGNÓSTICO DAS LESÕES MUSCULARES	24
2.5 AS CÉLULAS-TRONCO	26
3 MÉTODOS	30
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	30
3.2 ANIMAIS	30
3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	31
3.3.1 Anestesia.....	31
3.3.2 Aspiração da Medula Óssea	31
3.3.3 Centrifugação do Aspirado de Medula Óssea	32
3.3.3.1 Processamento da amostra.....	32
3.3.3.2 Contagem das células nucleadas e teste de viabilidade celular.....	33
3.3.4 Técnica Cirúrgica	33
3.3.5 Pós-Operatório	36
3.4 EUTANÁSIA.....	36
3.5 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E MÉTODOS DE MENSURAÇÃO.....	36
3.5.1 Avaliação Histológica	37
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4 RESULTADOS	41
4.1 NÚMERO DE CÉLULAS MUSCULARES/ μm^2	42
4.2 PROPORÇÃO DE FIBROSE	43
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

As lesões musculares compõem um dos problemas mais desafiadores da traumatologia esportiva pois, apesar de serem comuns, seu tratamento ainda é controverso e, muitas vezes, ineficiente^{1,2,3,4}. Habitualmente longos períodos de afastamento são necessários para que o atleta retorne plenamente às suas atividades, e sequelas podem fazer parte do resultado final^{1,3}.

O processo de cicatrização do tecido muscular costuma se iniciar prontamente assim que ocorre um traumatismo, porém pode evoluir de maneira lenta e irregular, dificultado por uma formação excessiva de tecido conjuntivo cicatricial (fibrose)^{2,3,4,5,6}. Este tecido cicatricial em excesso inibe a regeneração completa da estrutura muscular preexistente e, por ser mais frágil e irregular, contribui para a recidiva local da lesão, impedindo a recuperação completa da função muscular^{2,3,4,5,6}.

O tratamento mais empregado nas lesões musculares é o conservador, do qual fazem parte medidas como repouso, imobilização do membro afetado por tempo variável, aplicação local de gelo e acompanhamento fisioterápico^{2,3,6}. Em alguns casos, dependendo da gravidade da lesão, pode ser indicada a sua reparação cirúrgica^{2,3,6}. Embora estes tratamentos frequentemente conduzam a bons resultados clínicos, parecem ter efeito limitado sobre a recuperação funcional e o risco de recidiva².

As referidas limitações deram origem a pesquisas buscando medidas biológicas capazes de estimular o processo de regeneração muscular e prevenir a formação de fibrose^{1,2}. Por meio destes estudos foi possível a identificação mais completa das vias celulares e moleculares envolvidas na regeneração muscular e o entendimento da função das células satélites e das células-tronco multipotentes, capazes de diferenciação miogênica durante a regeneração muscular^{4,5,7}. A melhor compreensão do processo de reparação muscular abriu então perspectivas para o desenvolvimento de novas terapias^{4,7}.

Recentemente, técnicas de reparação, substituição e regeneração tecidual têm alcançado resultados promissores, empregando conhecimentos de engenharia tecidual, incluindo a captura e o transplante de células precursoras, uso de matrizes bioativas, hormônios peptídeos e fatores de crescimento^{8,9,10}.

Apesar das terapias baseadas na adição local de culturas de células-tronco embrionárias produzidas “in-vitro” terem demonstrado a capacidade de diferenciação em células musculares (miócitos), a cultura e o transplante de células indiferenciadas da medula óssea são procedimentos complexos, caros e que têm tecnologia restrita a grandes centros de pesquisa^{8,11}. Por isso, a aplicação local de aspirados de medula óssea, contendo células-tronco adultas, tem sido pesquisada clínica e experimentalmente^{8,11}. Estas últimas possuem potencial de diferenciação tecidual limitado em relação às células-tronco embrionárias, porém são capazes de originar células ósseas, cartilagosas e musculares⁸. Como a adição local de miócitos está relacionada com um aumento da regeneração muscular no sítio lesado, a aplicação local de um número suficiente de suas células precursoras constitui uma abordagem promissora na tentativa de melhorar a cicatrização muscular⁴.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito positivo da adição de um centrifugado de medula óssea na cicatrização de lesão muscular em coelhos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético dos vertebrados é derivado de células precursoras mesodérmicas, originadas dos somitos⁷. A especificação para a linhagem miogênica, durante o desenvolvimento embrionário, originando mioblastos, é regulada pela presença nestas células dos Fatores de Regulação Miogênica (MRF) MyoD e/ou Myf5, que são fatores de transcrição hélice-alça-hélice básicos⁷. Os mioblastos, então, retiram-se do ciclo celular para tornarem-se miócitos que expressam os MRF tardios miogenina e MRF4, e posteriormente genes musculares específicos como cadeias pesadas de miosina (MHC) e creatina quinase⁷. Uma subpopulação de mioblastos falha em se diferenciar, mas continua associada à superfície da fibra muscular em desenvolvimento como células satélites quiescentes⁷. Os miócitos mononucleares fundem-se uns aos outros para formarmiotubos multinucleares, longos e cilíndricos, com núcleos centrais, que por sua vez tornam-se fibras musculares contráteis, com os núcleos migrando periféricamente sob o sarcolema^{2,7}.

Após a maturidade sexual, o músculo esquelético é um tecido estável, caracterizado por fibras musculares pós-mitóticas multinucleadas⁷.

Constituindo de 40% a 45% do peso corporal total, o músculo esquelético representa a maior massa de tecido do corpo². Suas funções principais são a atividade locomotora, comportamento postural e respiração^{5,7}. É formado por dois componentes principais: as fibras musculares e uma matriz extracelular de tecido conjuntivo que circunda redes organizadas de nervos e vasos sanguíneos^{1,2,5}. O tecido conjuntivo fornece a estrutura necessária para a produção de movimento articular e locomoção, concentrando a contração das fibras musculares em um esforço conjunto, e também dá suporte ao processo de regeneração após a lesão^{1,2}. Cada fibra muscular é presa, em ambas as suas extremidades, ao tecido conjuntivo de um tendão ou à fascia similar ao tendão, na chamada junção miotendínea¹.

Os músculos esqueléticos são altamente vascularizados para receberem nutrientes essenciais para a função muscular⁷. Quando a fibra muscular

amadurece, é contatada por um neurônio motor único e expressa moléculas características para a função contrátil, principalmente diferentes isoformas de MHC e enzimas metabólicas^{5,7}.

As fibras musculares são o elemento básico do músculo esquelético^{2,7} (Figura 1). São células em forma de fita, com o comprimento variando de uns poucos milímetros até mais de 50 cm, e com o diâmetro variando de 15 a 20 μm até mais de 100 μm ¹. Seu citoplasma, chamado sarcoplasma, contém uma matriz celular e organelas, incluindo o aparelho de Golgi, mitocôndrias, o retículo sarcoplasmático, gotículas de lipídios, glicogênio e mioglobina².

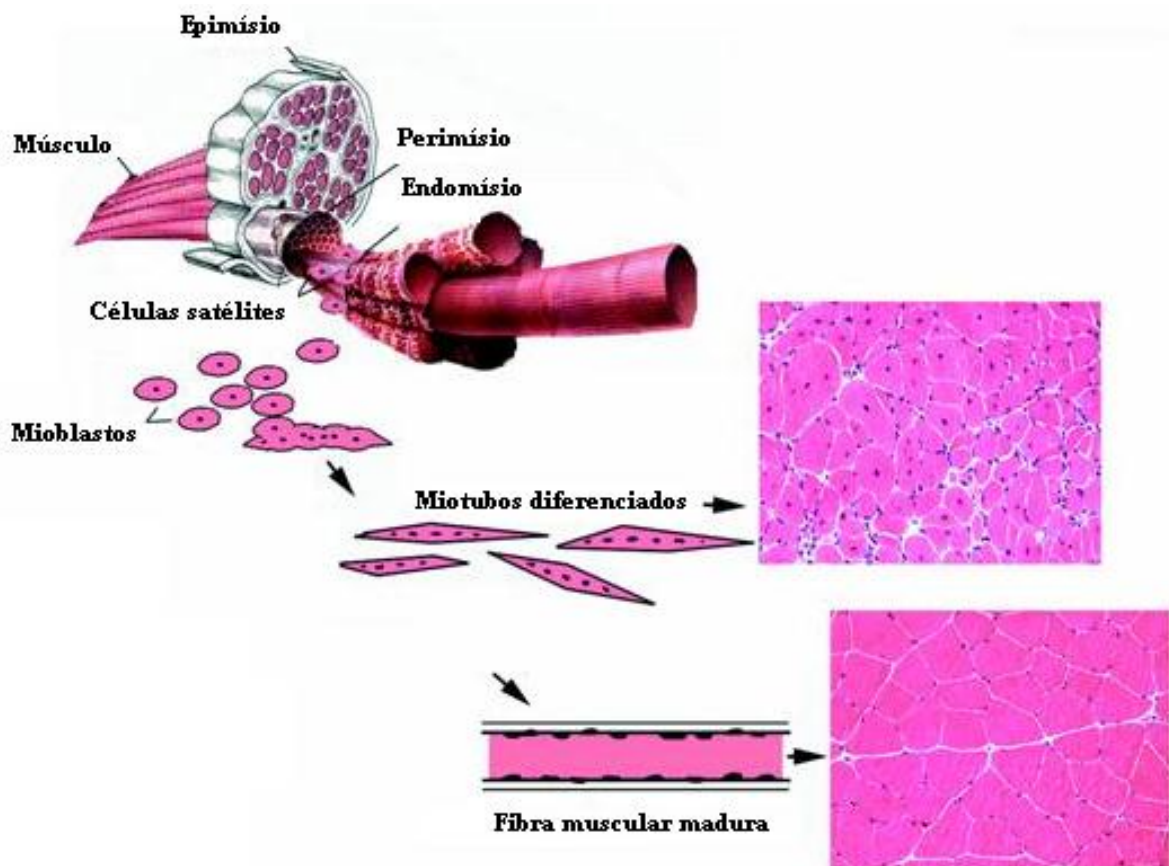


Figura 1 – Desenho esquemático da estrutura do músculo esquelético. O endomísio é formado por tecido conjuntivo que envolve cada fibra muscular individualmente, o perimísio envolve fascículos (grupos de fibras musculares) e o epimísio é a camada mais externa que envolve todo o músculo.

Uma estrutura de tecido conjuntivo, formada por três níveis de bainhas, une as fibras musculares individuais^{1,7}. A camada que envolve a fibra muscular individualmente é chamada de endomísio ou membrana basal^{1,2,7}. O

perímio envolve de algumas dezenas a algumas centenas de fibras musculares em fascículos ou feixes^{1,2,7}. E o epímio, uma bainha mais forte e mais grossa, circunda todo o ventre muscular^{1,2}. A disposição das fibras musculares, paralelas ou oblíquas ao eixo mais longo do músculo, é determinante para as propriedades contráteis e funcionais do músculo esquelético².

A membrana plasmática que envolve cada fibra muscular é o sarcolema². A membrana basal ou lâmina basal constitui a camada de tecido conjuntivo externa, com espessura de 100 a 200 nm, composta de uma camada interna, uma camada intermediária translúcida e uma lâmina densa externa². A membrana basal contém inúmeras proteínas compreendendo colágeno, fibronectina, laminina e muitas glicoproteínas². As células satélites, localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática, desempenham um papel chave na regeneração muscular^{2,3}.

2.2 A CICATRIZAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

A cicatrização do músculo esquelético segue um padrão relativamente constante e independente do tipo de lesão^{1,2,7}. Foram identificadas neste processo três fases interligadas e dependentes do tempo: fase de destruição, fase de reparo e fase de remodelação (Figura 2), sendo as duas últimas associadas ou sobrepostas^{1,2,3,7}.

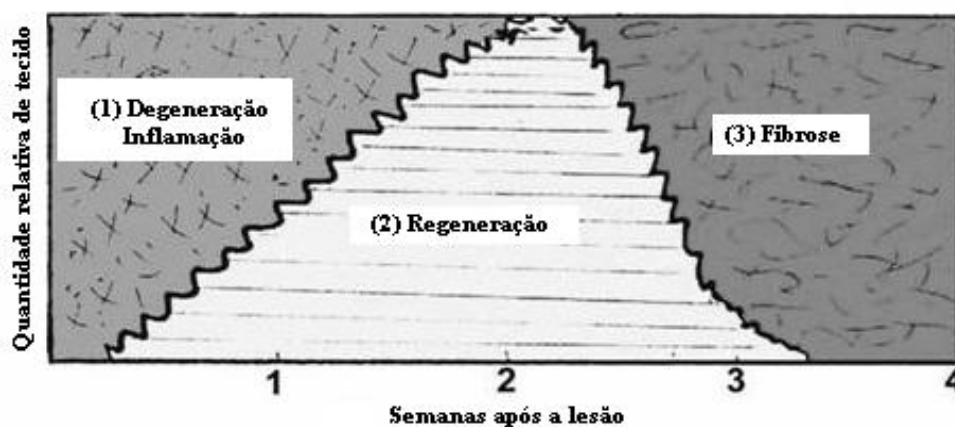


Figura 2 – As diferentes fases da cicatrização muscular após lesão.

A fase de destruição é caracterizada pela ruptura e consequente necrose das fibras musculares, formação de hematoma entre os cotos e reação inflamatória celular, ocorrendo nos primeiros dias após a lesão^{1,2,3,5,6,7}.

Uma força mecânica excessiva que se estende por toda a secção transversal da fibra muscular acaba por destruir a integridade do sarcolema e da lâmina basal, favorecendo o ingresso de cálcio extracelular que ativa proteases intrínsecas, como as calpaínas que decompõem miofibrilas e proteínas do citoesqueleto, levando à autólise focal ou total e aumentando os níveis séricos de proteínas musculares como a creatina quinase^{2,5,7}. Com a ruptura do sarcoplasma, existe a possibilidade de extensão da necrose por todo o comprimento da fibra muscular, porém este processo é interrompido pelo isolamento do defeito na membrana plasmática por uma condensação do citoesqueleto, chamada banda de contração, e pelas vesículas de lisossomos que atuam como membrana temporária^{1,2,7}.

O edema local e a formação de hematoma ocorrem rapidamente entre as fibras musculares rompidas^{1,2,3,5,6}. A lesão dos vasos sanguíneos propicia o acesso direto de células inflamatórias circulantes, incluindo fagócitos que invadem o hematoma e começam a desfazer o coágulo sanguíneo^{1,5,6}. A fibrina e a fibronectina, derivadas do sangue, fazem ligações cruzadas para formar o tecido de granulação, uma matriz extracelular inicial, contribuindo para a fixação de fibroblastos, que podem ser derivados de células miogênicas, e fornecendo a força inicial para suportar as forças de contração^{1,6}.

Inicialmente, os neutrófilos são as células mais abundantes, mas logo são substituídos por monócitos que são transformados em macrófagos, o tipo de célula inflamatória predominante^{1,5,7}. Os macrófagos participam da proteólise e fagocitose do material necrótico pela liberação de enzimas dos lisossomos, e ativam as células miogênicas^{1,5,7}.

O dano à integridade das células residentes no músculo ativa e libera fatores de crescimento que se encontravam inativados pela aderência às proteoglicanas e a outros constituintes da matriz extracelular¹. O músculo lesado, células mononucleares, macrófagos ativados, linfócitos T, fibroblastos e células satélites liberam fatores que ativam células inflamatórias residentes no músculo². Estas células, por sua vez, fornecem sinais quimiotáticos adicionais, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, para as células inflamatórias circulantes^{1,2,5,7}.

Vários fatores são conhecidos serem expressos na lesão muscular: fator de necrose tumoral- α (TNF- α); fator de crescimento de fibroblastos (FGF); fator de crescimento insulín-like (IGF-1, IGF-2); fator transformador de crescimento (TGF- α , TGF- β); fator de crescimento de hepatócito (HGF); fator de crescimento epidérmico (EGF); interleucina (IL) 1, IL-1 β , IL-6 e IL-8; fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AA e PDGF-BB); e moléculas de adesão (selectina-P, selectina-L e selectina-E)^{1,2,7}. Estes fatores desempenham uma ampla gama de funções no processo inflamatório, influenciando o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular local, acelerando a resposta inflamatória, e são também potenciais ativadores e reguladores da proliferação e diferenciação de células precursoras miogênicas e de mioblastos, e da fusão de miotubos em fibras musculares multinucleadas maduras durante o processo de regeneração^{1,2}.

A fase de reparo consiste na fagocitose do tecido necrótico, na regeneração das fibras musculares, na produção concomitante de cicatriz de tecido conjuntivo e reconstituição da matriz extracelular, bem como na revascularização e reinervação da área lesada, sendo a progressão equilibrada destes processos essenciais um pré-requisito para a recuperação ótima da função contrátil do músculo^{1,3,4,6,7}. A regeneração ocorre habitualmente sete a dez dias após a lesão, geralmente atingindo o ápice em duas semanas, e então diminui em três a quatro semanas². A formação de tecido cicatricial (fibrose) começa entre a segunda e a terceira semanas após a lesão, tecido este que aumenta de tamanho ao longo do tempo, parecendo ser o produto final desta fase².

A capacidade regenerativa do músculo esquelético é garantida por um mecanismo intrínseco que restaura o aparelho contrátil, embora as fibras musculares sejam consideradas pós-mitóticas irreversíveis¹. A proliferação celular é um evento importante e necessário para a regeneração, sendo que a divisão de células miogênicas constitui fonte suficiente de novos núcleos musculares⁷. As células miogênicas se diferenciam e se fundem, ou às fibras musculares degradadas para o reparo, ou umas às outras, para a formação de uma nova fibra muscular⁷.

As células satélites, células precursoras miogênicas quiescentes depositadas abaixo da lâmina basal de cada fibra muscular durante o desenvolvimento fetal, são a base do potencial de crescimento e de auto-renovação do músculo esquelético adulto, sendo consideradas uma população de células-tronco musculares^{1,3,5,6,12,13,14,15,16}. No entanto, o potencial de auto-renovação de

células satélites adultas é limitado, diminui com a idade, e pode ser esgotado por um processo regenerativo crônico¹⁵.

O número de células satélites residentes em um músculo adulto é muito menor do que o número de precursores comprometidos com a miogênese que preenchem o tecido muscular logo após uma lesão, pela migração de células satélites das fibras musculares adjacentes, ou mesmo de músculos vizinhos, e pelo recrutamento de células residentes não miogênicas, como fibroblastos, ou de células progenitoras mesenquimais¹⁵. Presume-se que a ruptura da lâmina basal e da membrana plasmática libere e ative as células satélites². Os cilindros preservados das lâminas basais que circundam as partes necróticas das fibras musculares servem como uma estrutura dentro da qual as células satélites viáveis começam a formação de novas fibras musculares¹. Os macrófagos, enquanto fagocitam os detritos necróticos que circundam as células satélites, enviam fatores de sobrevivência solúveis para estas células regenerativas^{1,5}.

O comportamento diferenciado das células satélites, tanto em vitro como in vivo, suporta a evidência de que estas células são de natureza heterogênea, e que uma pequena subpopulação delas mostra características de células-tronco¹⁶. Em resposta à lesão, e após a degeneração de fibras musculares nas áreas de necrose, num processo equivalente ao desenvolvimento embrionário, as células satélites proliferam lentamente, se diferenciam em mioblastos, que após poucas divisões celulares fundem-se uns aos outros para formarem miotubos multinucleados com núcleos centrais que, por sua vez, formam novas fibras musculares ou se fundem com a parte sobrevivente da fibra muscular^{1,2,3,5,7,13,15}. As fibras musculares recém-formadas são basofílicas, pela alta síntese de proteínas, e expressam formas embrionárias de MHC^{6,7}. A fusão celular não é difusa durante a regeneração, mas sim focal para o local da lesão⁷. A divisão ou ramificação da fibra muscular também é uma característica da regeneração, provavelmente devida à incompleta fusão das fibras musculares dentro da mesma lâmina basal⁷.

As partes em regeneração das fibras musculares adquirem então sua forma madura com estriações transversais normais e núcleos musculares localizados periféricamente^{1,7}. Sob condições normais, o músculo regenerado é morfológica e funcionalmente indistinguível do músculo não danificado⁷. A proliferação de células satélites pode continuar por nove a dez dias, dependendo da gravidade da lesão².

No músculo esquelético maduro existem pelo menos duas populações principais de células satélites^{1,16}. As células satélites clássicas que residem entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular, e as células-tronco musculares localizadas fora da lâmina basal, dentro do tecido conjuntivo do músculo esquelético^{1,15}. As células satélites clássicas podem ser divididas em células satélites comprometidas e células-tronco satélites. As células satélites comprometidas estão prontas para começar a diferenciação em mioblastos imediatamente após a lesão. As células-tronco satélites passam primeiro por divisões celulares antes da diferenciação, reabastecendo o reservatório de células satélites, e parece haver uma subpopulação de células capazes de diferenciação além de linhagens miogênicas, não apenas em diferentes linhagens mesenquimais, mas também em neurais e endoteliais¹. As células-tronco musculares, em resposta à lesão, prontamente originam mioblastos e diferenciam-se em miotubos¹.

Após o preenchimento dos cilindros da velha lâmina basal com as fibras musculares em regeneração, estas se estendem em direção à cicatriz de tecido conjuntivo que se formou entre os cotos, formando múltiplos ramos, que começam a aderir ao tecido conjuntivo, formando mini-junções miotendíneas^{1,5}.

Em seguida, fibroblastos iniciam a síntese das proteínas e proteoglicanas da matriz extracelular para restaurar a integridade da estrutura do tecido conjuntivo^{1,3}. Entre as primeiras das proteínas sintetizadas estão a tenascina-C e a fibronectina, a qual primeiro transforma-se em fibrilas multiméricas, e depois forma a superfibronectina com grandes propriedades adesivas¹. Ambas possuem propriedades elásticas, sendo capazes de esticar em várias vezes o seu comprimento de repouso, proporcionando força e elasticidade precoce ao tecido de granulação, capacitando o uso do membro lesado antes da conclusão do processo de reparo^{1,3}. A expressão da fibronectina é logo seguida pela do colágeno tipo III, e a produção de colágeno tipo I é iniciada apenas dias depois, embora permaneça elevada por várias semanas^{1,5}.

A cicatriz de tecido conjuntivo produzida no local da lesão é o ponto mais fraco do músculo logo após o trauma, mas sua resistência à tração aumenta com a produção de colágeno tipo I, que forma ligações cruzadas intermoleculares durante a maturação do tecido cicatricial, e cerca de dez dias após o trauma, a cicatriz já não é a mais fraca ligação, com as rupturas ocorrendo dentro do tecido muscular adjacentes às recém-formadas mini-junções miotendíneas, entre as fibras

musculares regeneradas e o tecido cicatricial¹. Um tempo relativamente longo ainda é necessário até que a força do músculo seja completamente restaurada¹.

A restauração do suprimento vascular é o primeiro sinal de regeneração e um pré-requisito para a recuperação morfológica e funcional do músculo¹. Os novos capilares brotam de troncos sobreviventes dos vasos sanguíneos, em direção ao centro da área lesada, para prover um adequado suprimento de oxigênio, possibilitando o metabolismo energético aeróbico para as fibras musculares em regeneração¹. Os miotubos têm poucas mitocôndrias e metabolismo anaeróbico aumentado, mas o metabolismo aeróbico constitui a principal fonte de energia nos estágios finais da regeneração¹.

A regeneração mal sucedida dos nervos intramusculares pode interromper a regeneração do músculo esquelético¹. A formação de miotubos ocorre mesmo na ausência de inervação, mas a atrofia ocorre se a reinervação não é concluída¹. Na denervação neurogênica, a reinervação requer o crescimento de um novo axônio distal à ruptura¹. O contato nervo-músculo é restabelecido muito rapidamente porque os axônios são rompidos geralmente dentro ou próximos do músculo¹. Garret et al.⁶ observaram que a recuperação funcional depende da inervação, pois aquela é significativamente prejudicada pela presença de grande porcentagem de fibras musculares denervadas localizadas distalmente ao local da lesão.

Na ruptura das fibras musculares, a continuidade da unidade tendão-músculo-tendão é interrompida, a força contrátil não pode ser transmitida, e durante a contração os cotos são ainda mais afastados¹. As extremidades das fibras musculares em regeneração, tentando penetrar o tecido cicatricial, mantêm uma aparência de cone por um período de tempo relativamente longo, durante o qual não podem fixar-se firmemente à cicatriz¹. As fibras musculares, através de suas partes intactas e em regeneração, reforçam sua adesão à matriz extracelular em seus aspectos laterais, reduzindo o movimento dos cotos, a tração na cicatriz ainda frágil, e o risco de nova ruptura, permitindo algum uso do músculo antes da completa cicatrização¹. A adesão lateral não ocorre na ausência de estresse mecânico, sendo este um pré-requisito¹.

Mais tarde, fortes adesões terminais, consistindo das mesmas moléculas de adesão das junções miotendíneas normais (agrupamentos de moléculas associadas à integrina e à distrofina), são estabelecidas nas extremidades

dos cotos¹. Portanto, a unidade tendão-fibra muscular-tendão original torna-se substituída por duas unidades tendão-fibra muscular-mini-junção miotendínea sucessivas, separadas pela cicatriz, que se contraem sincronicamente por terem sido reinervadas pelo mesmo nervo¹. Na matriz extracelular das novas mini-junções miotendíneas, moléculas elásticas e adesivas são altamente expressas, absorvendo as forças criadas pelas contrações musculares¹. Tendo restabelecido firme adesão terminal através destas mini-junções miotendíneas, as fibras musculares não precisam mais da adesão lateral reforçada, e então diminui a expressão de integrinas no sarcolema lateral¹.

A fase de remodelação é um período durante o qual ocorrem a maturação das fibras musculares regeneradas, a contração e a reorganização do tecido cicatricial, e a recuperação da capacidade funcional do músculo^{1,3}. Com o tempo, o grande tecido de granulação condensa-se em uma pequena massa de tecido conjuntivo, composta principalmente de colágeno tipo I, diminuindo de tamanho a cicatriz interposta, e trazendo os cotos em estreita aderência uns aos outros, até que as fibras musculares tornem-se entrelaçadas, embora provavelmente não reunidas^{1,6}. Ainda é desconhecido se os cotos finalmente fundem-se uns aos outros, ou se alguma forma de septo de tecido conjuntivo permanece entre eles¹.

2.3 MECANISMOS DE LESÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

As lesões musculares podem ser causadas por uma variedade de mecanismos, incluindo trauma direto (laceração, contusão, distensão, intensa atividade física) ou causas indiretas (isquemia, disfunção neurológica, anormalidades genéticas congênitas)^{1,2,7}. Mais de 90% de todas as lesões esportivas são ou contusões ou distensões, sendo as lacerações as lesões musculares mais raras¹.

A contusão muscular ocorre quando o músculo é sujeito a uma súbita e pesada força de compressão, como um golpe direto, sendo típica de esportes de contato, com a ruptura ocorrendo no local do impacto ou adjacente a este¹. No músculo contraído a lesão é mais superficial, enquanto no músculo relaxado a ruptura é geralmente adjacente ao osso porque a compressão do impacto

é transmitida através das camadas musculares até a superfície óssea¹. Na distensão uma força excessiva de tração submetida ao músculo leva a uma sobrecarga das fibras musculares e, conseqüentemente, a uma ruptura localizada em uma das extremidades, próxima à junção miotendínea, normalmente ocorrendo em musculatura superficial entre duas articulações, sendo a corrida e o salto as atividades mais comumente associadas¹. A laceração muscular ocorre quando o músculo é cortado transversalmente após trauma direto por objeto afiado³.

As lesões musculares podem ser classificadas pelo tipo ou gravidade e pelo mecanismo da lesão¹⁷.

As lesões musculares podem ser agrupadas em três tipos que diferem quanto ao potencial de cura, com base nos componentes deixados intactos¹⁷. O tipo I representa a lesão que danifica as fibras musculares, mas deixa intactos a lâmina basal e os outros componentes da matriz extracelular, os vasos sanguíneos e os nervos¹⁷. São exemplos deste tipo de lesão o traumatismo fechado, o estiramento leve e a isquemia temporária¹⁷. Estas lesões curam através da regeneração espontânea das fibras musculares que restauram a estrutura e as funções musculares¹⁷.

As lesões do tipo II resultam de dano isolado ao nervo periférico, traumatismo fechado ou de estiramento do nervo e do músculo¹⁷. Estas lesões danificam o suprimento nervoso com dano às fibras musculares, mas deixam intactos o suprimento vascular e a matriz extracelular, a qual mantém a estrutura muscular¹⁷. Se as fibras nervosas em regeneração atingirem as junções neuromusculares intactas, pode existir a restauração da função¹⁷.

No tipo III, ocorre a perda ou necrose de todos os componentes do tecido muscular, incluindo as fibras musculares, matriz extracelular, suprimento sanguíneo e nervoso¹⁷. Resultam de traumatismo fechado grave, ruptura ou traumatismo penetrante¹⁷. Se o suprimento vascular permanece intacto, a resposta inflamatória é capaz de remover o tecido necrótico¹⁷. Porém, algumas lesões comprometem o suprimento sanguíneo e o músculo necrótico não pode ser removido¹⁷. Se o tecido necrótico for removido, a regeneração pode ser iniciada¹⁷. Células capazes de diferenciação em mioblastos sobrevivem até mesmo a lesões graves ou migram para dentro do local da lesão¹⁷. Entretanto, a falta de matriz extracelular para guiar a regeneração das fibras musculares geralmente impede a formação de tecido muscular organizado¹⁷. A falta de orientação para a reinervação

impede as fibras musculares regeneradas de obterem função normal¹⁷. O resultado geralmente é a cura com formação de cicatriz fibrótica excessiva com a presença de mioblastos esparsos tentando formar fibras musculares¹⁷. Na laceração, a regeneração muscular é limitada pelo desenvolvimento de uma grande cicatriz fibroblástica, resultando em recuperação funcional incompleta¹⁷.

Quanto ao mecanismo, as lesões musculares são classificadas em traumatismo fechado, traumatismo penetrante e traumatismo de ruptura ou estiramento, causadas pela aplicação de uma carga externa¹⁷. No traumatismo fechado, as lesões leves são do tipo I da classificação anterior, as moderadas são do tipo II, onde a função é geralmente restaurada, e as por esmagamento são as do tipo III, que se curam com a formação de grande tecido cicatricial e fibras musculares pouco contráteis, diminuindo a força muscular¹⁷. O traumatismo penetrante é representado pelas lacerações isoladas ou pela combinação de traumatismo fechado com lacerações, sendo então lesões do tipo III¹⁷. Os fragmentos musculares separados curam com a formação de tecido cicatricial, apresentando pequeno número de miotubos regenerados, sendo que regeneração verdadeira não foi demonstrada¹⁷. No traumatismo de ruptura ou estiramento, as lesões variam do tipo I ao tipo III, e podem ser enganadoras, pois tecido intacto superficial pode esconder ruptura interna grave do músculo¹⁷.

A classificação atual das lesões musculares identifica lesões leves, moderadas e graves, baseadas no comprometimento clínico que trazem¹. Distensão/contusão leve (primeiro grau) representam o rompimento de apenas umas poucas fibras musculares com menor inchaço e desconforto acompanhado por nenhuma ou apenas mínima perda de força e restrição dos movimentos¹. Distensão/contusão moderada (segundo grau) é um grande dano do músculo com perda clara da função (habilidade para contrair)¹. Distensão/contusão grave (terceiro grau) é um rompimento se estendendo através de toda a secção transversal do músculo e, assim, resultando numa perda completa da função muscular¹.

2.4 DIAGNÓSTICO DAS LESÕES MUSCULARES

O diagnóstico das lesões musculares começa com uma história clínica detalhada, destacando-se as circunstâncias da ocorrência de um trauma, seguido de um exame clínico completo que inclui a inspeção e palpação da região envolvida e realização de teste de função dos músculos lesionados, com e sem resistência externa¹. O diagnóstico é fácil quando uma história típica de contusão muscular ou estiramento é acompanhada de evidência objetiva de edema e/ou equimose distal à lesão, ou quando uma falha pode ser palpada no ventre muscular (Figura 3)¹. Hematomas pequenos ou profundos, embaixo do ventre muscular, podem ser mais difíceis de diagnosticar clinicamente, mas os exames de imagem (ultrasonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética) possibilitam a sua identificação adequada e também permitem a mensuração da extensão da lesão muscular¹. A ultrasonografia (Figura 4) foi tradicionalmente considerada o método de escolha no diagnóstico das lesões musculares, principalmente por ser relativamente barata¹. Porém, tem a desvantagem de depender largamente da experiência do radiologista, e por isso gradativamente tem sido substituída pela ressonância magnética¹.

A ressonância magnética apresenta alta acurácia na detecção de lesões musculares, além de fornecer uma visualização bastante detalhada da lesão (Figura 5)¹.



Figura 3 – Lesão da musculatura posterior da coxa. (A) Evidência de grande equimose local. (B) Evidência de ruptura muscular e falha visível.

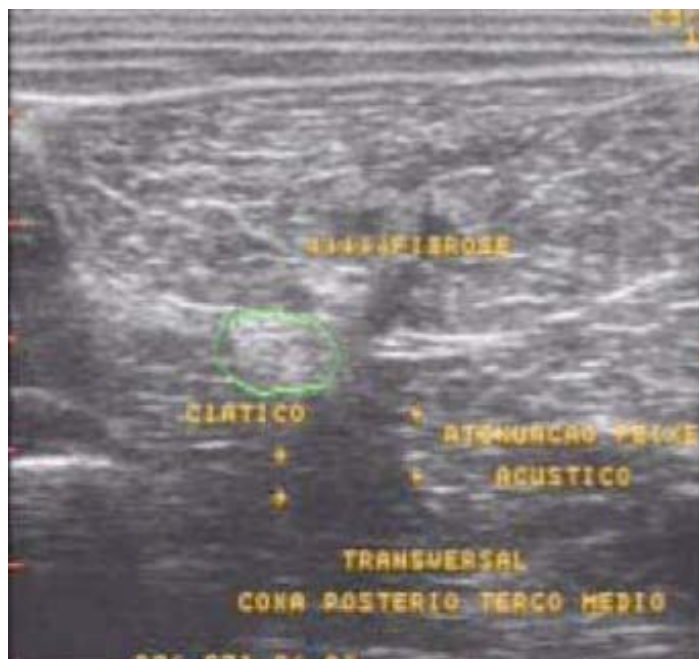


Figura 4 – Imagem de ultrasonografia da musculatura da parte posterior da coxa demonstrando lesão em fase final de cicatrização.

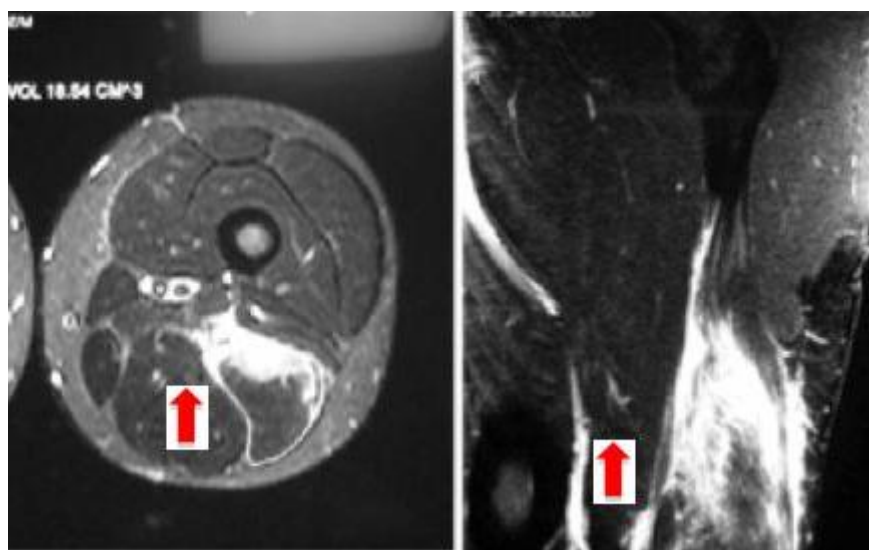


Figura 5 – Imagem de ressonância magnética da coxa nas incidências axial (esquerda) e coronal (direita) evidenciando grande lesão da musculatura adutora, com edema importante (setas).

O diagnóstico da lesão muscular pela história clínica e exame físico é suficiente na maioria dos casos, porém a ultrasonografia é uma ferramenta válida para uma caracterização mais exata da lesão¹. Se houver uma discrepância entre os

sintomas do paciente, os achados de exame físico e a ultrasonografia, a ressonância magnética deve ser o método diagnóstico de escolha¹.

2.5 AS CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células indiferenciadas, provenientes do embrião, feto ou adulto que, sob certas condições, têm a habilidade única de auto-renovação. São células capazes de proliferação e produção de diferentes células especializadas, e da regeneração de tecidos^{1,8,18,19}.

As células-tronco adultas estão presentes em tecidos diferenciados (medula óssea, sangue, córnea e retina do olho, cérebro, músculo esquelético, polpa dental, fígado, pele e pâncreas), são capazes de auto-renovação e de gerar todas as células especializadas do tecido em que se originam^{8,19}. Estas células sofrem divisão assimétrica, gerando duas células filhas: uma célula-tronco que possui o mesmo fenótipo e todas as propriedades da célula-tronco mãe, sendo também capaz de auto-renovação, e uma célula que prolifera simetricamente, geralmente por muitas divisões, originando um grande número de células progenitoras^{8,18,19}. As células progenitoras ou precursoras são parcialmente especializadas, sofrendo divisão simétrica com a formação de novas células progenitoras ou de células especializadas, nenhuma das quais capazes de auto-renovação, substituindo células lesadas ou mortas e mantendo a integridade e as funções teciduais^{8,19}.

O processo de auto-renovação é importante porque se todas as células filhas se tornassem progenitoras, a população de células-tronco diminuiria progressivamente, resultando em uma depleção rápida desta população de células, necessárias para os processos de remodelação e reparo de todos os tecidos normais, moduladas por sinais químicos e físicos que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência^{8,20,21}.

A medula óssea é um órgão composto por dois sistemas principais que originam linhagens celulares distintas: o sistema hematopoiético e o seu estroma de suporte^{8,21}. Foram definidos dois grupos de células-tronco na medula óssea: células-tronco hematopoiéticas, que dão origem às células sanguíneas e às do sistema imune, e as células-tronco do estroma ou mesenquimais, capazes de se

diferenciar em diversos tipos de células específicas de tecidos, podendo formar osso, cartilagem, gordura, músculos cardíaco e esquelético, tendões, tecido neural e fígado^{8,12,18,19,20,21}. Portanto, a medula óssea pode servir como um reservatório de células progenitoras para o tecido muscular¹⁵.

As células-tronco adultas, dependendo de um meio adequado, podem ser geneticamente reprogramadas para originar células especializadas características de outros tecidos, o que foi chamado de plasticidade^{7,8,19,24}. Porém, o trabalho de Wagers et al.²⁴ indicou que a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em células não hematopoiéticas não é um resultado comum do programa de desenvolvimento destas células, sugerindo fortemente que, se existem células residentes na medula óssea com ampla capacidade para diferenciação em células não hematopoiéticas, elas provavelmente não são células-tronco hematopoiéticas.

As células-tronco pós-natais podem ser divididas em duas categorias: não específicas do tecido e específicas do tecido¹. As células-tronco não específicas do tecido são de origem hematopoiética, capazes de originar células sanguíneas e do sistema imune^{1,8,19}. As células-tronco específicas do tecido diferenciam-se preferencialmente em células do tecido em que residem, embora também possuam a habilidade limitada de transformarem-se em outras linhagens¹. Estudos recentes têm demonstrado a presença de células-tronco multipotentes em vários tecidos adultos, capazes de originar células diferenciadas com características de outros tecidos, contrariando a hipótese da predeterminação das células-tronco específicas do tecido^{7,8,19}.

Em relação às células-tronco e a cicatrização muscular, até recentemente presumia-se que as células-tronco específicas do tecido muscular (as células satélites “clássicas” e as localizadas fora da lâmina basal) eram a única fonte de núcleos para o processo de reparo^{1,7}. Várias observações têm contestado a origem das células satélites a partir dos somitos, sugerindo que algumas células miogênicas, com características funcionais semelhantes às das células satélites, originam-se de células-tronco derivadas da medula óssea⁷. Não há nenhuma prova definitiva quanto à possibilidade ou não de células satélites serem recrutadas da medula óssea para o músculo sob condições fisiológicas ou patológicas¹².

Achados recentes demonstraram a presença de duas populações diferentes de células-tronco multipotentes, que podem contribuir para a regeneração:

células-tronco não residentes no músculo e células-tronco residentes no músculo^{1,7}. No reparo muscular, as células-tronco não residentes no músculo parecem invadir o local da lesão, diferenciando-se em células satélites^{1,7,12,25}. Progenitores miogênicos derivados da medula óssea podem migrar para um músculo em degeneração, participar do processo de regeneração, e dar origem a fibras musculares diferenciadas¹⁵. Estas células parecem ser recrutadas por sinais de longo alcance, possivelmente inflamatórios, provenientes da degeneração de tecidos, e parecem acessar o músculo danificado a partir da circulação, juntamente com os granulócitos e macrófagos¹⁵. A cinética da diferenciação de progenitores derivados da medula óssea difere da cinética da diferenciação de precursores adultos comprometidos com a miogênese, pois aqueles passam por várias etapas, mais longas, no processo de diferenciação, como migração, divisão celular, compromisso com a linhagem miogênica, maturação e fusão terminal¹⁵.

As células-tronco não derivadas do músculo e as derivadas do músculo, além das células satélites, são capazes de diferenciação miogênica e integram-se no músculo na regeneração in vivo, mas a relação entre estas populações de células não foi definida⁷. Foi demonstrado também que células progenitoras isoladas da medula óssea, músculo adulto, compartimento neuronal e vários tecidos mesenquimais podem se diferenciar na linhagem miogênica^{1,7}. As células-tronco adultas do músculo e da medula óssea demonstraram se diferenciar em células musculares in vitro e contribuir para a regeneração do músculo in vivo⁷. Na medula óssea foi também identificada uma outra fonte de células-tronco musculares, nomeada população periférica, que contém células-tronco hematopoiéticas apresentando atividade miogênica^{7,14}.

As células miogênicas derivadas da medula óssea não apenas contribuem para a regeneração das fibras musculares, mas também reabastecem o reservatório de células satélites^{1,7,12,14,15,16,26,27}. Após transplante, as células derivadas da medula óssea podem adotar características de células satélites musculares e, sob certas condições, a frequência de conversão daquelas células para a linhagem miogênica pode ser aumentada⁷.

Em termos de potencial terapêutico, as células-tronco não modificadas derivadas do músculo revelaram-se capazes de regeneração nas distrofias musculares e, quando geneticamente modificadas para expressar fatores de crescimento, são versáteis em promover a cicatrização de lesões em tecidos

músculo-esqueléticos diferentes, como no osso (fraturas) e ligamentos (rupturas), ou em inibir efeitos indesejáveis como a formação de ossificação heterotópica^{1,28}. Por outro lado, parte da atividade biológica de fatores de crescimento, como IGF-1, é derivada de sua habilidade para recrutar células-tronco derivadas da medula óssea para o local da lesão¹. Células periféricas derivadas do músculo e da medula óssea mostraram-se capazes de diferenciação em várias linhagens após o transplante intravenoso^{16,27}.

O transplante de células-tronco mesenquimais objetiva a compensação da deficiência no número e/ou atividade destas células^{8,18}. A cultura de células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea é um processo complexo e caro, e por isso têm sido empregados aspirados de medula óssea administrados diretamente no local pretendido⁸. O termo células progenitoras do tecido conjuntivo foi adotado para descrever a população heterogênea de células-tronco mesenquimais e células progenitoras existentes nos aspirados de medula óssea, capazes de proliferação e diferenciação em um ou mais fenótipos do tecido conjuntivo^{8,18}. O aspirado de medula óssea é a fonte mais acessível de células-tronco mesenquimais pluripotentes adultas, contendo uma média de quarenta milhões de células nucleadas por mililitro, havendo entre estas duas mil células progenitoras conjuntivas, aproximadamente⁸.

Deste modo, com o reconhecimento da ampla distribuição de células-tronco adultas pluripotentes na medula óssea e virtualmente em todos os outros tecidos conjuntivos, a terapia baseada em células-tronco, particularmente a terapia de engenharia genética, detém grande potencial para o tratamento de uma variedade de desordens e condições afetando o músculo esquelético lesado e seu tecido conjuntivo^{1,8,22,27}.

3 MÉTODOS

Este estudo experimental foi avaliado e aprovado, em 13 de março de 2007, pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, seguindo as diretrizes da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, e do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (1996)²⁹, da *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International*.

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo experimental em modelo animal.

3.2 ANIMAIS

No experimento foram utilizados quinze coelhos machos, adultos, da raça Nova Zelândia Branco (*Oryctolagus cuniculus*), com peso médio de 3 Kg, idade aproximada de quatro meses, provenientes da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá, e criados no Biotério do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram avaliados por médico veterinário e ficaram alojados em gaiolas metálicas individuais, iluminadas diariamente por 12 horas contínuas, com temperatura, umidade e ruído ambientes sendo mantidos estáveis, alimentando-se de água “ad libitum” e de ração industrial apropriada, balanceada e peletizada.

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

3.3.1 Anestesia

O procedimento anestésico foi baseado no protocolo de anestesia preconizado pelo *Canadian Council on Animal Care*, no *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, Volume 1, 1993³⁰. Foi aplicado em cada animal, como medicação pré-anestésica, 1 mg/Kg de sulfato de atropina, por via intramuscular. A anestesia iniciou-se com a aplicação intramuscular, na região proximal do membro pélvico, de uma solução contendo 40 mg/Kg de cloridrato de ketamina a 10%, associada a 5mg/Kg de cloridrato de xilazina. Logo após a indução anestésica, os animais foram identificados com numeração, de 1 a 15, tatuada na orelha esquerda. A administração fracionada de cloridrato de xilazina 1 mg/Kg foi realizada quando necessário o prolongamento da anestesia.

3.3.2 Aspiração da Medula Óssea

A região da crista ilíaca direita foi tricotomizada, e após assepsia e anti-sepsia, realizou-se a punção da medula óssea da crista ilíaca posterior, com agulha calibre 16 com trocarte. Com movimentos de rotação, atingiu-se a cavidade medular, o trocarte foi retirado, e conectou-se à agulha uma seringa plástica descartável de 10 ml, cuja parte interna foi previamente embebida em solução de heparina a 1:1000. Foram aspirados aproximadamente 5 ml de medula óssea por meio de sucção, por tração firme do êmbolo da seringa. O aspirado de medula óssea foi então transportado imediatamente, em banho de gelo, para o Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina.

3.3.3 Centrifugação do Aspirado da Medula Óssea

3.3.3.1 Processamento da amostra

O material aspirado da medula óssea foi processado em câmara de fluxo laminar em condições estéreis. Para dispersar os agregados celulares, a amostra de 5 ml da seringa plástica foi transferida para um tubo graduado estéril, inicialmente por meio de agulha calibre 19, e a seguir com agulha calibre 22. O material foi centrifugado a 400g e a 20°C, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o aspirado coletado forma três níveis diferentes (Figura 6). Uma camada superior formada pelo plasma, uma camada intermediária formada pelo “buffy-coat”, e uma camada inferior formada pelas hemácias. Em seguida, foi descartado o sobrenadante, de aproximadamente 2 ml, com pipeta Pasteur estéril. Foram coletados 0,5 ml do “buffy-coat” do material sedimentado no tubo.

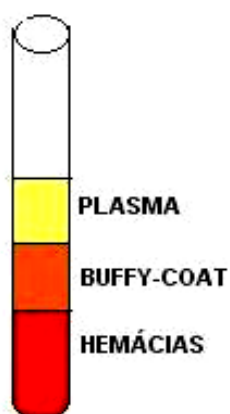


Figura 6 – Resultado da centrifugação do aspirado de medula óssea.

Usando-se o vórtex, o material foi homogeneizado. Foi coletada, então, uma amostra de 50 µl, em um tubo Eppendorf, para realização da contagem e do teste de viabilidade celular. Aproximadamente 0,5 ml do material retornou para o experimento.

3.3.3.2 Contagem das células nucleadas e teste de viabilidade celular

Os 50 µl de centrifugado de medula óssea foram previamente diluídos na proporção de 1:20, contendo 10 µl da amostra de células e 190 µl de diluente PBS 0,1 M, pH 7,4. Realizou-se então a diluição com o azul tripano, na proporção de 1:20, contendo 20 µl das células diluídas a 1:20, e 380 µl de azul tripano a 0,1%. Colocou-se este preparado na câmara de Neubauer, preenchendo-a completamente e deixando-a em repouso por 5 minutos em câmara úmida.

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste com azul tripano. Foi contado o número de células nucleadas nos quatro quadrados laterais, separando-se a contagem em grupo de células viáveis e de células mortas. Realizou-se o cálculo do número de células e da viabilidade celular de acordo com seguintes fórmulas:

$$\text{N}^\circ \text{ de células por ml} = (\text{n}^\circ \text{ de células viáveis} + \text{n}^\circ \text{ de células mortas}) \times 10^7$$

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{células viáveis} \times 100}{\text{células viáveis} + \text{células mortas}}$$

3.3.4 Técnica Cirúrgica

O animal anestesiado foi posicionado em decúbito dorsal em mesa operatória. Realizou-se então a tricotomia das faces anteriores das pernas direita e esquerda, a assepsia e a antisepsia com sabão degermante e álcool iodado a 5%, e foram montados os campos cirúrgicos fenestrados estéreis.

Realizou-se uma via de acesso ântero-medial, longitudinal, no terço médio do membro posterior, com aproximadamente 3 cm de extensão. Procedeu-se a dissecação por planos, abordando-se pele, tecido subcutâneo e fascia, os quais foram afastados, expondo-se o corpo do músculo tibial anterior (Figura 7). Com o uso de uma lâmina de bisturi n° 15, realizou-se uma ferida lacerante transversal no corpo do músculo tibial anterior, através de 75% de sua largura e de 50% de sua espessura, a aproximadamente 60% de seu comprimento a partir de sua origem proximal (Figura 8).



Figura 7 – Via de acesso e exposição do músculo tibial anterior.



Figura 8 – Ferida lacerante no corpo do músculo tibial anterior.

Em seguida, foram feitos pontos de reparo proximal e distal, a 5 mm de distância dos rebordos da lesão muscular, utilizando-se fio de sutura mononylon 4.0, antevendo a dificuldade para a localização do centro da lesão após a regeneração. Então, uma amostra de esponja de gelatina absorvível (Gelfoam®), de 1,0 x 0,5 cm, embebida com o centrifugado de medula óssea, foi colocada sobre a

lesão do músculo tibial anterior direito (Figura 9). Iniciou-se o fechamento por planos da ferida cirúrgica, com o uso de fio de sutura mononylon 4.0, que após foi ocluída com curativo impermeável estéril. O mesmo procedimento foi realizado no membro posterior esquerdo, porém apenas a esponja de gelatina absorvível foi aplicada no local (Figura 10).



Figura 9 – Reparo muscular e esponja de gelatina absorvível embebida em centrifugado de medula óssea na lesão do músculo tibial anterior direito.

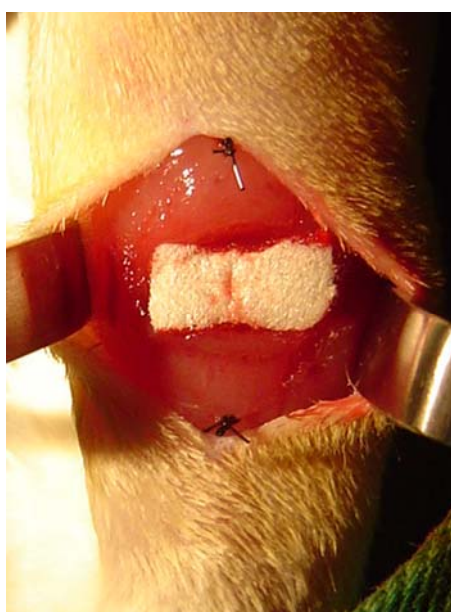


Figura 10 – Reparo muscular e esponja de gelatina absorvível na lesão do músculo tibial anterior esquerdo.

3.3.5 Pós-Operatório

Ao término da cirurgia, o animal foi isolado dos outros animais, colocado em caixa apropriada, e aquecido. Foi administrada uma dose intramuscular de antibacteriano e antiinflamatório, contendo penicilina G benzatina, penicilina G procaína, sulfato de diidroestreptomocina e piroxicam. Após a recuperação anestésica total, o coelho foi devolvido à sua gaiola, recebendo água e ração à vontade. A carga total nos membros operados foi liberada e permitida imediatamente, sem qualquer tipo de restrição ou imobilização.

3.4 EUTANÁSIA

Trinta dias após a data da cirurgia, os animais foram sacrificados. Realizou-se a eutanásia longe dos outros animais, em sala separada. Optou-se pela eutanásia por agentes químicos, por ser menos traumática e indolor. Foi realizada anestesia, com a aplicação intramuscular de uma solução contendo 120 mg/Kg de cloridrato de ketamina 10%, associada a 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina, na região proximal do membro pélvico, seguida da administração intra-cardíaca de solução de cloreto de potássio a 20%. Seguiu-se a resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. O descarte das carcaças dos animais, após a retirada das peças anatômicas para o estudo histológico, foi realizado em local apropriado, de acordo com as normas de biossegurança da resolução nº 5, de 5 de agosto de 1993, do Conselho Nacional do Meio Ambiente.

3.5 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO E MÉTODOS DE MENSURAÇÃO

A avaliação dos resultados foi realizada pela mensuração histológica quantitativa (número de células musculares por μm^2 e proporção de fibrose) da

cicatrização da lesão muscular, comparando-se o músculo tibial anterior direito com o esquerdo.

3.5.1 Avaliação Histológica

Os músculos tibial anterior direito e esquerdo de cada animal foram dissecados cuidadosamente, de sua inserção proximal até a sua inserção distal, e retirados. Foram localizados os pontos cirúrgicos de reparo proximal e distal, a 5 mm do local da lesão, e o músculo tibial anterior foi seccionado entre estes pontos (Figura 11A).

A seguir, as metades proximais e distais dos músculos foram colocadas em recipientes adequados, fixadas em solução de formalina a 10%, e identificadas com o número do coelho e membro posterior correspondente (direito ou esquerdo).

As amostras do tecido muscular foram então desidratadas e embebidas em parafina para o estudo histológico, orientadas de modo que a localização da face da linha média permitisse secções transversais do ponto médio da lesão (Figura 11B).

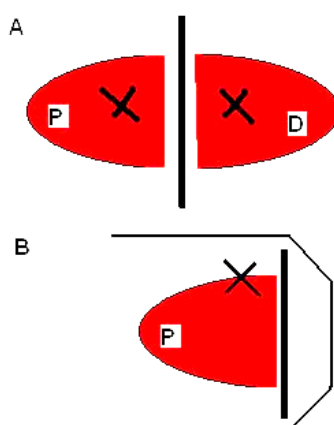


Figura 11 – Pontos de reparo e orientação para a secção. (A) Músculo tibial anterior com pontos de reparo a 5 mm de distância dos rebordos da lesão muscular. P, proximal, D, distal. (B) Bloco proximal mostrando a orientação para a secção transversal e o ponto de reparo.

Dos blocos de parafina foram obtidos cortes histológicos de 4 μm de espessura, que seguiram a rotina histológica para coloração pela hematoxilina-eosina, para avaliação histopatológica e histomorfométrica.

A avaliação quantitativa dos tecidos formados, comparando-se os cortes histológicos realizados a partir da face da linha média dos segmentos dos músculos tibial anterior direito e esquerdo de cada coelho, foi realizada através da histomorfometria da região intermediária da lesão muscular (Figura 12).

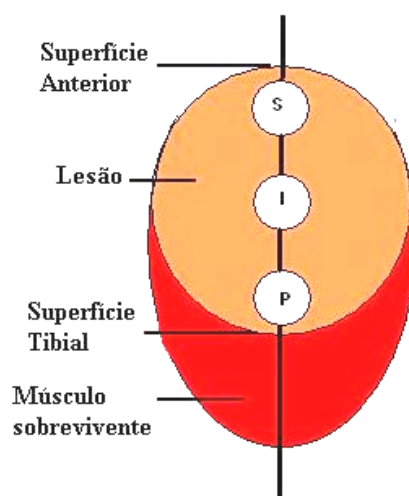


Figura 12 – Seção transversal mostrando as três regiões da lesão. Superficial (S), intermediária (I) e profunda (P), ao longo da linha média da área regenerada.

A estação de trabalho consiste de microscópio Zeiss® trinocular, uma vídeo-câmera colorida (Sony® CCD IRIS), com placa digitalizadora de imagens, um microcomputador com processador Pentium® 133 MHz, IBM-PC® compatível, operando em ambiente Windows 95® 32 bits. As imagens obtidas em 10 campos microscópicos são digitalizadas com auxílio do software Kontron Electronic 300 (Zeiss®), proporcionando a possibilidade de compartilhamento de dados com o processador de textos (Microsoft Word®) e planilha eletrônica (Microsoft Excel®). A utilização deste programa proporciona a análise, o tratamento, a interpretação e a obtenção de valores de mensuração das estruturas com todas as variáveis e a distribuição automática dos dados. A transmissão óptica é quantificada a fim de se processar e analisar a imagem e, para que esta seja quantificada em suas medidas originais, transforma-se a medida da imagem digitalizada, o pixel, em medida micrometrada. Para tal utilizamos a calibração de pixel em micrômetros. A calibração

das imagens é realizada para imagens obtidas em aumentos de 10, 20, 40 e 100 vezes. O fator de calibração é calculado automaticamente, em pixels, e este fator é utilizado pelo software para os cálculos correspondentes em micrômetros. As imagens são analisadas pelo software Kontron Electronic 300 (Zeiss®) para determinação de área, comprimento e contagem de partículas, contendo ferramenta que permite identificar determinada estrutura, colocá-la em evidência, e automatizar sua marcação.

As lâminas contendo cortes de tecido muscular, submetido à lesão traumática, foram analisadas sob microscópio de luz Zeiss®. Após aquisição da imagem com objetiva de 20 aumentos e ocular de 10 aumentos (Figura 13), utilizamos o recurso para marcar a área muscular do campo a ser avaliado e as fibras musculares a serem quantificadas (Figura 14). Os achados foram então documentados em imagens digitalizadas captadas com auxílio do sistema analisador de imagem Kontron Electronic 300 (Zeiss®), para a avaliação quantitativa. Esta rotina, semi-automatizada, foi realizada em cada campo da lâmina em estudo, sendo 10 campos por lâmina. Os resultados obtidos em cada campo, correspondentes à área analisada (número de células musculares por μm^2 e proporção de fibrose), foram arquivados em planilha Microsoft Excel® para posterior análise estatística.

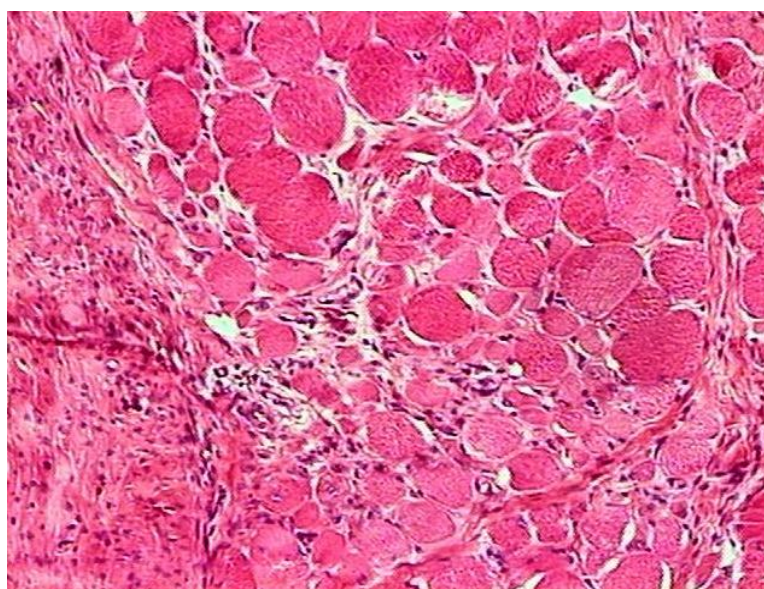


Figura 13 – Visualização de área de regeneração muscular em região intermediária de lesão com microscopia óptica comum. Coloração HE. Aumento de 100x.



Figura 14 – Demarcação dos tecidos formados na área de regeneração muscular para análise quantitativa com histomorfometria. O tecido muscular regenerado está delimitado pela linha amarela e a área de fibrose pela linha azul.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no Departamento de Estatística, do Centro de Ciências Exatas, da Universidade Estadual de Londrina.

O resultado da contagem de células e do exame anatomopatológico é apresentado na Tabela 1.

Foram calculados a média, o desvio-padrão, a mediana e a amplitude interquartil das variáveis quantitativas contínuas.

Tabelas estatísticas e gráficos de coluna (média \pm desvio-padrão) apresentaram a estatística descritiva das variáveis: número de células musculares/ μm^2 (Tabela 2 e Gráfico 1) e proporção de fibrose (Tabelas 3 e Gráfico 2).

Em relação ao teste estatístico, para comparar as lesões dos músculos tibial anterior direito, tratadas com centrifugado de medula óssea, e esquerdo (controle), foi utilizado o teste de Wilcoxon, para a inferência sobre a diferença entre as observações das amostras pareadas e não paramétricas (Tabelas 2 e 3).

O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$).

4 RESULTADOS

Na tabela 1 estão expostos os resultados da contagem de células e do teste de viabilidade celular, obtidos após a centrifugação do aspirado de medula óssea.

Tabela 1 – Resultado da contagem de células nucleadas por microscopia óptica após teste com azul tripiano para a determinação da viabilidade celular.

COELHO	VOLUME DA PUNÇÃO (ml)	CONTAGEM MÉDIA (10^7 células / ml)	CÉLULA NUCLEADA						Viabilidade Celular (%)
			Viável			Inviável			
			1 ^a	2 ^a	M	1 ^a	2 ^a	M	
1	5,0	10,2	97	100	99	2	4	3	97,0
2	5,0	3,4	32	34	33	1	1	1	97,0
3	4,0	4,9	51	44	48	1	1	1	97,9
4	5,0	4,6	40	47	44	1	2	2	95,6
5	3,0	7,8	73	78	76	1	3	2	97,4
6	3,0	6,7	65	62	64	3	3	3	95,5
7	5,0	5,0	53	43	48	3	1	2	96,0
8	6,0	7,5	66	69	68	6	8	7	90,6
9	7,0	9,5	94	90	92	2	4	3	96,8
10	4,5	13,6	130	132	131	4	5	5	96,3
11	5,5	5,9	56	55	56	2	4	3	94,9
12	6,0	8,1	78	71	75	6	5	6	92,5
13	5,0	4,7	47	40	44	3	3	3	93,6
14	5,5	7,9	72	77	75	2	6	4	94,9
15	5,5	4,0	31	42	37	2	4	3	92,5

onde:

- 1^a = Primeira contagem
- 2^a = Segunda contagem
- M = Contagem média

A estatística descritiva das variáveis estudadas foi relatada em tabelas estatísticas e na forma de gráficos de coluna:

4.1 Número de células musculares/ μm^2 (Tabela 2 e Gráfico 1).

4.2 Proporção de fibrose (Tabela 3 e Gráfico 2).

4.1 NÚMERO DE CÉLULAS MUSCULARES/ μM^2

Tabela 2 – Estatística descritiva do número de células musculares por micrômetro quadrado na região intermediária da lesão do músculo tibial anterior. Comparação dos músculos tratados com centrifugado de medula óssea e controles pelo teste de Wilcoxon ($\alpha=0,05$)

COELHO	NÚMERO DE CÉLULAS MUSCULARES/ μm^2	
	Centrifugado de Medula Óssea (CMO)	Controle (C)
1	0,000202916	0,000202135
2	0,000754903	0,000339927
3	0,000522031	0,000297436
4	0,000156089	0,000417183
5	0,000364207	0,000569724
6	0,000376955	0,000339927
7	0,000587284	0,000400628
8	0,000366809	0,000348273
9	0,000422149	0,000417183
10	0,000304373	0,000207598
11	0,000476781	0,000147504
12	0,000242805	0,000182104
13	0,000327787	0,000195111
14	0,000143407	0,000176034
15	0,000392351	0,000196672
Média \pm Desvio-padrão	0,000376 \pm 0,0001647	0,000296 \pm 0,0001219
Diferença (CMO-C)	0,000080 \pm 0,0001796	
Mediana (Amplitude interquartil)	0,000367 (0,0002340)	0,000297 (0,0002055)
Diferença (CMO-C)	0,000061 (0,0001949)	
Wilcoxon	S=32	p=0,0730

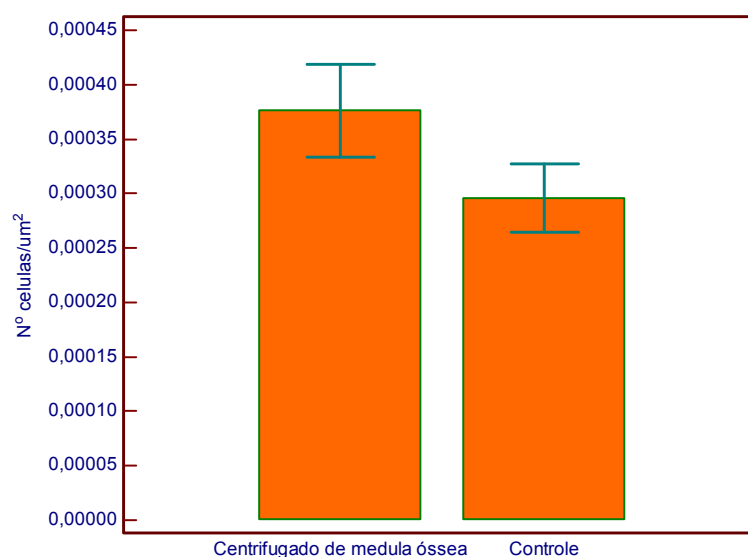


Gráfico 1 – Número de células musculares por micrômetro quadrado na região intermediária da lesão do músculo tibial anterior tratada com centrifugado de medula óssea e controle

4.2 PROPORÇÃO DE FIBROSE

Tabela 3 – estatística descritiva da proporção de fibrose na região intermediária da lesão do músculo tibial anterior. comparação dos músculos tratados com centrifugado de medula óssea e controles pelo teste de Wilcoxon ($\alpha=0,05$)

COELHO	PROPORÇÃO DE FIBROSE	
	Centrifugado de Medula Óssea (CMO)	Controle (C)
1	0,601304503	0,469212643
2	0,525683356	0,642372385
3	0,361749355	0,445195018
4	0,666412294	0,377530994
5	0,676205576	0,593659394
6	0,343374895	0,699801392
7	0,555734885	0,500963831
8	0,500546007	0,583348253
9	0,387811732	0,379854791
10	0,567422834	0,491287125
11	0,646452016	0,373363420
12	0,663838047	0,543644596
13	0,630006334	0,513283371
14	0,302357471	0,672787984
15	0,595458640	0,448178945
Média ± Desvio-padrão	0,534957±0,12778	0,515632±0,10568
Diferença (CMO-C)	0,019325±0,19402	
Mediana(Amplitude interquartil)	0,567423 (0,25864)	0,500964 (0,14846)
Diferença (CMO-C)	0,076136 (0,21554)	
Wilcoxon	S=13	p=0,4887

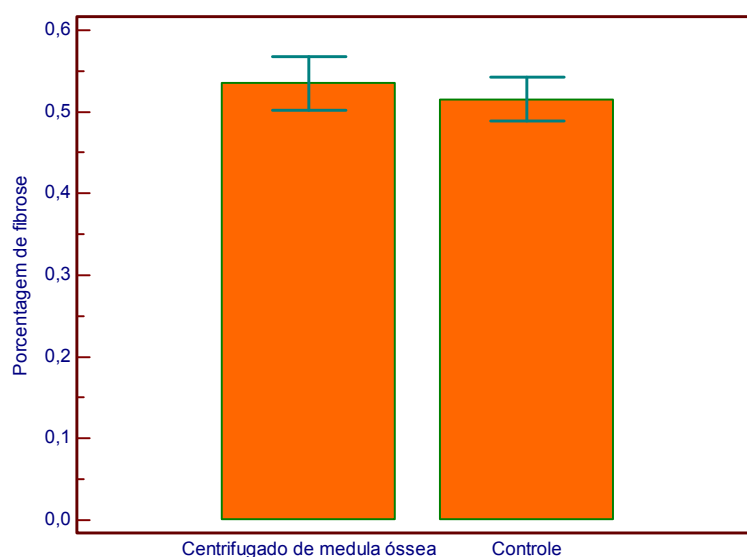


Gráfico 2 – Proporção de fibrose na região intermediária da lesão do músculo tibial anterior tratada com centrifugado de medula óssea e controle.

5 DISCUSSÃO

Alguns aspectos técnicos devem ser elucidados para maior entendimento dos objetivos deste trabalho.

Primeiramente, o uso do coelho neste experimento deveu-se ao fato deste animal apresentar um sistema músculo-esquelético muito semelhante ao do ser humano, principalmente o esqueleto apendicular, sendo por isso frequentemente selecionado para a realização de procedimentos cirúrgicos experimentais nos ossos, músculos e articulações. O esqueleto apendicular do coelho compõe-se do conjunto de ossos que suportam os dois pares de membros (anterior e posterior). O membro anterior ou torácico é formado pela escápula, braço, antebraço e mão, enquanto que o membro posterior ou pélvico é formado pela bacia, coxa, perna e pé.

A escolha do músculo tibial anterior para a realização da lesão deveu-se à sua localização anatômica e a ser cirurgicamente acessível. O estudo bilateral, no caso das lesões dos músculos tibial anterior direito e esquerdo, permitiu a utilização de um menor número de animais e a comparação direta entre os tratamentos.

A realização da ferida lacerante no músculo tibial anterior seguiu o protocolo de Menetrey et al.³, para evitar uma secção transversal total do ventre muscular, possibilitando uma regeneração muscular mais semelhante entre os músculos lesados. A lesão realizada a aproximadamente 60% do comprimento do músculo, a partir de sua origem proximal, procurou evitar a lesão do nervo motor no seu ponto de entrada no músculo⁶.

A utilização de pontos de reparo proximal e distal, a 5 mm de distância dos rebordos da lesão muscular, seguiu procedimento descrito por Marlow et al.³², antevendo a dificuldade para a localização macroscópica do centro da lesão após a regeneração, o que poderia levar à seleção de uma região imprópria para a análise.

Quanto ao preparo do centrifugado, cuidou-se para que a medula óssea fosse aspirada em pequenas frações, pois de acordo com Hernigou et al.³³, este procedimento reduz o grau de diluição do aspirado pelo sangue periférico. Também Muschler et al.³⁴ demonstraram que a realização de punção, limitando o

volume do aspirado a 2 ml, foi mais efetiva que uma única punção com volume maior.

A centrifugação do aspirado de medula óssea, conforme técnica descrita por Connolly et al.³¹, forma uma camada intermediária, o “buffy-coat”. No “buffy-coat” se encontra uma maior quantidade de células nucleadas, das quais fazem parte os precursores hematopoiéticos e células do estroma da medula óssea^{8,11,33}. No estroma se encontram as células-tronco mesenquimais e progenitoras^{8,11,33}.

A viabilidade celular, avaliada pelo teste com azul tripano, um sulfonato de diazo-naftaleno amplamente utilizado como corante, é baseada no fato de que a membrana celular íntegra impede a entrada do corante azul nas células nucleadas viáveis ou vivas^{8,31}. Nas células inviáveis ou mortas, o corante penetra através da membrana celular incompetente, deixando estas com uma coloração azul escura^{8,31}. Nossos resultados confirmam a importância da centrifugação do aspirado de medula óssea para aumentar a concentração de células nucleadas, constatada pelo teste de viabilidade celular, além de não haver destruição celular significativa, em concordância com outros autores^{7,8,31,33}.

O uso da esponja de gelatina absorvível (Gelfoam®), embebida com o centrifugado de medula óssea, colocada sobre a lesão do músculo tibial anterior, mostrou-se útil para evitar a difusão ampla do centrifugado e por permitir sua presença prolongada no local da lesão, estando de acordo com a literatura^{5,8,35,36}. A esponja de gelatina absorvível atua como uma ponte para promover a regeneração de tecidos e, além disso, é biocompatível e bioabsorvível, tendo sido utilizada com sucesso para reparar defeitos teciduais na traquéia, esôfago, estômago, intestino delgado e nervos periféricos⁵. Em estudo experimental desenvolvido por Kin et al.⁵, demonstrou-se que a esponja é absorvida completamente em três semanas, permite o controle de sangramentos e inibe a infiltração de células inflamatórias, prevenindo assim a formação de cicatriz excessiva⁵.

A opção por não manter o coelho imobilizado no pós-operatório deveu-se ao fato de que, segundo Jarvinen¹, foi demonstrado que a mobilização precoce induz um crescimento capilar mais rápido e intenso para a área lesada, melhor regeneração e uma orientação mais paralela das fibras musculares, enquanto a inatividade foi associada com atrofia significativa das fibras musculares e deposição excessiva de tecido conjuntivo. Outros estudos, porém, demonstraram

também que a mobilização ativa, iniciada imediatamente após a lesão, resulta num grande tecido conjuntivo cicatricial, com prejuízo da penetração das fibras musculares através da cicatriz¹. Iniciar a mobilização ativa após curto período de imobilização seria o ideal, pelo fato de aumentar a penetração das fibras musculares através do tecido conjuntivo cicatricial, limitar o tamanho da cicatriz permanente, facilitar o alinhamento apropriado das fibras musculares em regeneração, e ajudar no ganho de força de tensão no músculo lesado¹.

Uma das dificuldades deste estudo foi de que, após a eutanásia, mesmo após a marcação realizada durante a lesão muscular, conforme recomendam Marlow et al.³², a localização do ponto médio da lesão mostrou-se difícil, concordando com a experiência de outros autores^{3,6,32}.

A análise histológica de secções transversais da área de lesão muscular é considerada mais adequada por evitar a contagem múltipla de miotubos³². A análise de secções longitudinais pode resultar em imprecisão na quantificação de miotubos, pois estes podem aparecer mais de uma vez, devido ao arranjo não linear destas células³².

A região ideal para a quantificação da regeneração muscular foi observada estar dentro da zona intermediária da lesão, onde residem as principais diferenças na regeneração^{32,37}. A regeneração na zona intermediária parece ocorrer independentemente do suprimento vascular e em um ambiente não influenciada pelo reparo fibroso, refletindo apenas o potencial miogênico³². A zona profunda, adjacente ao músculo sobrevivente, pode ser influenciada pela proximidade das fibras musculares ilesas e suprimento vascular intacto³². Na zona superficial, adjacente à fascia e à pele, miotubos recém-formados podem ser influenciados pelo apoio estrutural da membrana basal e pelo fornecimento de sangue associados, podendo estar presentes independentemente da capacidade de regeneração³².

Enquanto as diferenças qualitativas na regeneração muscular já estão bem documentadas, a quantificação dessas diferenças tem se revelado difícil^{32,37}. A opção pela análise histomorfométrica da regeneração muscular mostrou-se adequada para a avaliação das diferenças quantitativas na regeneração, estando de acordo com a opinião de Marlow et al.³² e Mitchell et al.³⁷.

Apesar de já ter sido demonstrado que células-tronco adultas da medula óssea, principalmente as células mesenquimais derivadas do estroma, podem se diferenciar em uma linhagem miogênica, contribuindo para a regeneração

muscular^{7,15}, em nosso estudo, apesar do maior número de células musculares/ μm^2 no grupo tratamento, este aumento não foi significativo.

De acordo com Matziolis et al.⁴, a transferência imediata de célula precursora miogênica após lesão resulta em sobrevivência celular menor do que 10% no quinto dia após o trauma, causada pelos fatores celulares e humorais que fazem parte dos processos de inflamação fisiológica durante os primeiros dias após a lesão. Além disso, o dano à microvascularização resulta em resposta regenerativa pobre nesta fase⁴. Comprovadamente, estes fatores resultam num meio local que dificulta a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação de células transplantadas⁴, colaborando para justificar os resultados negativos encontrados em nosso estudo.

Apesar da regeneração tecidual mediada por células-tronco embrionárias “in vitro” ter potencial terapêutico promissor, segundo Musaro et al.¹⁴, a diferenciação no músculo esquelético de células-tronco adultas provenientes da medula óssea tem sido de pouco significado clínico. Alguns estudos sugerem inclusive que a frequência na qual as células derivadas da medula óssea contribuem para a regeneração muscular parece ser muito baixa ou até mesmo inexistente, mesmo na lesão^{1,7,12,25}.

Uma demonstração de que as células-tronco não musculares participam da regeneração muscular, foi apresentado em trabalho por Ferrari et al.¹⁵, onde se demonstrou a presença de células miogênicas derivadas da medula óssea de doador, transplantada por via intramuscular ou intravenosa, na musculatura do hospedeiro, mas a frequência com que esse evento ocorreu foi baixa. No estudo já citado de Musaro et al.¹⁴, o transplante de células-tronco derivadas de medula óssea teve um impacto limitado sobre a substituição de células musculares, sugerindo que o mau recrutamento de células-tronco circulantes é um dos fatores limitantes para a reparação tecidual. Da mesma forma, Gussoni et al.²⁷ observaram que após a administração intravenosa, células da população periférica da medula óssea foram capazes de contribuir para os núcleos das fibras musculares e de restaurar a expressão de distrofina no músculo em regeneração, porém também em níveis baixos.

Estes achados destacaram a incorporação pouco eficiente e lenta de células derivadas da medula óssea no músculo, em comparação com os mioblastos, sugerindo uma baixa eficácia e por isso com pouca vantagem como terapia nas lesões musculares^{7,15,26}.

No presente estudo, a maior proporção de fibrose no grupo do tratamento, apesar de não significativa, foi uma surpresa, demonstrando ser a formação excessiva de tecido conjuntivo cicatricial, conforme a opinião de outros autores, um problema ainda a ser resolvido^{2,3}.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o centrifugado de medula óssea não foi capaz de induzir uma melhor qualidade da cicatrização muscular, com regeneração de fibras musculares ao invés de formação de fibrose.

6 CONCLUSÃO

A administração do centrifugado de medula óssea utilizada neste estudo não favoreceu a cicatrização de lesão muscular em coelhos.

REFERÊNCIAS

1. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33(5):745-64.
2. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A(5):822-32.
3. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. *Am J Sports Med.* 1999 Mar-Apr;27(2):222-9.
4. Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, et al. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Eng.* 2006 Feb;12(2):361-7.
5. Kin S, Hagiwara H, Nakase Y, Kuriu Y, Nakashima S, Yoshikawa T, et al. Regeneration of skeletal muscle using in tissue engineering on an acellular collagen sponge scaffold in a rabbit model. *ASAIO J.* 2007 Jul-Aug;53(4):506-13.
6. Garrett WE Jr, Seaber AV, Boswick J, Urbaniak JR, Goldner JL. Recovery of skeletal muscle after laceration and repair. *J Hand Surg Am.* 1984 Sep; 9(5):683-92.
7. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):209-38.
8. Vaz CES. Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.
9. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1009-14.
10. Muschler G, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Jul;86-A(7):1541-58.
11. Connolly, JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1995 Apr;313:8-18.
12. Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukahara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, et al. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J Cell Sci.* 2002 Mar 15;115(Pt 6):1285-93.
13. Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z. Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter an alternative mesenchymal pathway. *J Cell Sci.* 2004 Oct 15;117(Pt 22):5393-404.

14. Musaro A, Giacinti C, Borsellino G, Dobrowolny G, Pelosi L, Cairns L, et al. Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 3;101(5):1206-10.
15. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998 Mar 6;279(5356):1528-30.
16. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol*. 2002 May 27;157(5):851-64.
17. Buckwalter JA, Cruess RL. A cura dos tecidos musculoesqueléticos. In: Rockwood CA, Green DP, Bucholz RW, editores. *Fraturas em adultos*. Terceira edição. São Paulo: Manole; 1993. p. 179-219.
18. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Feb;395:66-80.
19. United States of America. National Institutes of Health. Regenerative medicine. 2006. Available from: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/>.
20. Lin H. The self-renewing mechanism of stem cells in the germline. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Dec;10(6):687-93.
21. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.
22. Muschler GF, Midura RJ, Nakamoto C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. *J Biomed Biotechnol*. 2003;2003(3):170-93.
23. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.
24. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 2002 Sep 27;297(5590):2256-9.
25. LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 2002 Nov 15;111(4):589-601.
26. Dreyfus PA, Chretien F, Chazaud B, Kirova Y, Caramelle P, Garcia L, et al. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol*. 2004;164(3):773-9.
27. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999 Sep 23;401(6751):390-4.
28. Peng H, Huard J. Stem cells in the treatment of muscle and connective tissue diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2003 Jun;3(3):329-33.

29. Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academy Press; 1996.
30. Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. 1993; Volume 1.
31. Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *Bone Joint Surg Am*. 1989 Jun;71(5):684-91.
32. Marlow SA, McGeachie JK, Tennant M, Papadimitriou JM. A morphometric technique for the histological quantification of skeletal muscle regeneration. *J Anat*. 1996 Aug;189(Pt 1):151-8.
33. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jul;87(7):1430-7.
34. Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am*. 1997 Nov;79(11):1699-709.
35. Tay BK, Le AX, Heilman M, Lotz J, Bradford DS. Use of collagen-hydroxyapatite matrix in spinal fusion. A rabbit model. *Spine*. 1998 Nov 1; 23(21):2276-81.
36. Mankani MH, Krebsbach PH, Satomura K, Kuznetsov SA, Hoyt R, Robey PG. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. *Arch Surg*. 2001 Mar;136(3):263-70.
37. Mitchell CA, McGeachie JK, Grounds MD. Cellular differences in the regeneration of murine skeletal muscle: a quantitative histological study in SJL/J and BALB/c mice. *Cell Tissue Res*. 1992 Jul;269(1):159-66.