



ULTERIOR CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE REGENERAÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS ATRAVÉS DE ENXÊRTO NA MEDULA ESPINAL DORSO-LOMBAR, NO CÃO
(NOTA PRÉVIA)

P. CONTU
H. CAÑETE

Em prosseguimento das pesquisas sôbre enxêrto na medula espinal dorso-lombar (1, 2) procuramos verificar, surpreender com reduzida cronologia de pós-operatório, a regeneração das fibras nervosas.

Realmente o material apresentado nos precedentes trabalhos, com 31 até 44 dias após operatório, não permitia surpreender algumas fases precoces de regeneração e sôbre tudo o comportamento da mielina.

Vários autores se dedicaram a estudos da mielina na regeneração do S.N.C. e queremos lembrar o trabalho de Woolsey e cutros (3) que submeteram a homoenxêrto de medula, 47 dias após secção por ferimento com arma de fogo na região dorsal, um rapaz de 16 anos, e que faleceu 4 meses após a cirurgia: o exame macroscópico revelou continuidade anatômica do segmento distal com o enxêrto, comprovada também microscôpicamente pela presença de um certo número de fibras novas não mielinizadas, invadindo o enxêrto.

Sôbre a regeneração da medula espinal existem numerosos trabalhos anatomo-comparativos que merecem ser citados pelos resultados contrastantes obtidos

Para Migliavacca (4) a regeneração funcional da medula espinal é possível em mamíferos: seus estudos foram efetuados sôbre 24 fetos de camundongos e 38 animais recém-nascidos, comprovando em 2 dêles regeneração anatômica e funcional, 15-25 dias após a secção completa da medula na região lombar;

Trabalho realizado no Departamento de Neuratomia com auxílio da Fundação Rockefeller, do Conselho Nacional de Pesquisas e do Conselho de Pesquisas da U.F.R.G.S.

Cramer e Alpers (5) estudando as fibras da medula espinal submetida à hemisseccção, constataram que as células gliais tanto meso como ectodermais foram agentes ativos no processo de fagocitose dos restos degenerativos da medula espinal, sobre tudo a microglia e a oligodendroglia que continuaram sua atividade até que toda a mielina estivesse transformada.

Sugar e Gerard (6) comprovaram a recuperação anatômica e funcional da medula espinal de ratos com 3 a 5 semanas;

Brown e Mc. Couch (7) concluem que a regeneração não ocorre na medula espinal em virtude do bloqueio pelo tecido colágeno, que impede o crescimento e passagem do axônio;

Davidoff e Ransonhoff (8) trabalhando com ratos tentaram sem resultado obter regeneração de medula espinal;

Barnard e Carpenter (9) não conseguiram demonstrar capacidade regenerativa do S. N. C., em rato;

Windle e Chambers (10) obtiveram uma sensível redução da escara de tecido fibro-glial que forma-se entre as extremidades seccionadas da medula pela administração de pirogênio (polissacarídeo bacteriano). A redução da cicatriz acompanhou-se de regeneração das fibras nervosas, que alcançaram a extremidade oposta da medula em grande quantidade restabelecendo assim a unidade anatômica da medula. Não foi observada recuperação funcional até 59 dias após a lesão;

Freeman (11) seccionou a medula de 1750 ratos adultos dos quais 44 (3,5%) apresentaram recuperação funcional completa e cujas medulas microscopicamente revelaram continuidade dos axônios na área seccionada;

Windle, Clemente e outros (12) após extensivas experimentações, sobre a regeneração da medula em animais, concluem que dois fatores são fundamentais para alcançar uma regeneração significativa das fibras medulares: proporcionar adequado contacto entre os dois côtos da medula, aproximando-os bem, para evitar a formação de cicatriz fibroglial e combater o desenvolvimento desta cicatriz por meio da administração de PYROMEN (pirogênio);

Freeman e Colaboradores (13) efetuaram a hemisseccção da medula, em 79 cães adultos, tratando-os com tripsina, a fim de observar a recuperação anatômica e funcional dos animais. Após tratamento intensivo de 30 dias com a droga, sacrificou os animais entre 60 e 90 dias, notando que alguns mostraram já movimentos voluntário. Ao exame histológico observou-se a presença de feixes de fibras neoformadas, restabelecendo a continuidade anatômica da medula espinal;

Noback, Basset e Campbell (14) observaram a presença de numerosos axônios regenerados unindo os dois extremos da medula espinal, seccionada e enxertada com Millipore, e 3 meses

depois da secção apareceram numerosos os axônios linearmente arranjados. A pia-mater não invadiu o espaço entre os côtos, para firmar cicatriz, mas envolveu o tubo de Millipore;

Basset, Campbel e Hisby (15) empregando tubos de plástico Millipore, para formar uma ponte de união entre os dois extremos de nervos ou da medula, seccionados e submetidos à excisão de um pequeno segmento, obtiveram evidências de que tubos de plástico servem como suporte para a migração das células de origem leptomenínges, que por sua vez orientam os axônios em crescimento, no sentido de encontrar a extremidade do segmento oposto;

Noback e outros (16) com o emprêgo de material plástico sintético poroso (MILIPORE) com bainha ou luva na reconstrução de estruturas nervosas, observaram que o processo de regeneração é muito semelhante na medula e no nervo periférico;

Vários autores orientaram seus estudos na análise do papel sustentado no processo de mielinização pelo glia e lembramos as observações de Bunge e Bunge (17) sobre a mielinização da medula espinal após secção completa; os dois autores constataram relação entre oligodendrócitos e mielogênese e os primeiros sinais de mielinização aos 19 dias do pós-operatório.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando a técnica operatória descrita nos precedentes trabalhos, praticamos na medula dorso-lombar em 2 cães (1 macho e 1 fêmea respectivamente do pôso de 11 e 11,5 kg.). Secção completa com excisão de um segmento de 10-12 mm. e colocação de enxêrto cruzado. O animal de 11 kg morreu 2 dias após a operação, o outro foi sacrificado 11 dias após a operação com fixação em vivo com formol a 10%. Retirado o sistema nervoso central e colocado em formalina neutra a 10% durante 24 h., foi em seguida seccionada a medula dorso-lombar num trecho compreendido o enxêrto e os côtos proximal e distal, por uma extensão de 20mm. Como principal método histológico foi usado o método de Lison-Dagnelie, pela fácil execução técnica e pelos bons resultados obtidos no estudo da mielina na regeneração no sistema central e periférico; os métodos de Mallory e de hematoxilina férrica foram utilizados como auxiliares para orientação topográfica nos cortes.

OBSERVAÇÕES PRÓPRIAS

A continuidade macroscópica do enxêrto com os côtos proximal e distal da medula é estabelecida só na porção anterior da medula: na porção posterior o côto distal está em continuidade

com o enxerto em quanto o coto proximal está afastado levemente do enxerto por retração deste último.

Observamos com pequeno aumento, que a área do enxerto aparece estreitada e afunilada, sendo grande a quantidade de tecido conjuntivo e células gliais neste local.

Na porção anterior da medula vemos um feixe de fibras que transpõem, sem dificuldade, o tecido conjuntivo-glial e estabelece conexão entre os dois côtos medulares, passando por baixo do enxerto, que sofreu um deslocamento no sentido ântero posterior.

Em toda a região próxima ao enxerto, na periferia dos côtos medulares há intensa proliferação de células gliais. Observando as extremidades medulares, notamos a presença de bolas e fusos de mielina, de grande diâmetro e de pequenas granulações da mesma substância espalhadas difusamente entre as fibras e células. Em algumas áreas, temos a impressão de que estas formações de mielina obedecem a orientação das fibras, dispondo-se ao longo de seu trajeto.

As células gliais e alguns macrófagos, agrupam-se em torno destas formações fagocitando a mielina.

E' bastante nítida a redução de tamanho das células.

Tanto no coto proximal como no distal, as fibras estão intumescidas, com o contorno irregular, e de suas superfícies desprendem-se placas de mielina.

CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES

Antes de tudo achamos indispensável um breve comentário sobre os métodos Histológicos. Excluindo por motivos econômicos o método de Marchi, que teoricamente fornece os melhores resultados para o estudo da mielina, recaiu a escolha sobre o método de Lison-Dagnelie, por apresentar seletividade para a mielina e ser de fácil execução e permitir claras observações sobre as relações entre a mielina e as células gliais, salientando que o termo glia ou células gliais é por nós empregado para designar somente as células de origem ectodérmica constituindo a macroglia, para diferenciá-las das células da microglia que se transformam em macrófagos durante o processo regenerativo.

O fato de a continuidade anatômica entre enxerto e côtos ser completa só na porção anterior da medula não invalida nossas observações. O cuidado que tivemos ao visualizar os côtos medulares e assegurar-nos da completa secção dos feixes durante a operação exclue a possibilidade de que fibras tenham ficado intatas e portanto admitir que são fibras regeneradas.

Examinamos com atenção a peça anatômica e não encontramos na superfície medular nenhum feixe com posição anômala

que justificasse a possibilidade de se tratar de fibras regeneradas a partir das raízes nervosas àquele nível. Somos levados assim a aceitar serem estas fibras nervosas regeneradas, constituintes, provavelmente do cordão anterior da medula.

Uma regeneração em tão curto prazo, encontra similar só em nervos periféricos, segundo Perroncito (19), que constatou evidências de regeneração em período de 3 horas após a secção de nervos. cremos, também que a contigüidade das fibras neoformadas com a pia-mater, estrutura ricamente vascularizada, pode ser apontada como fator determinante na sua rápida regeneração, que contribuiu ainda na orientação das fibras, para o restabelecimento da conexão entre os dois extremos medulares.

Em relação ao comportamento na regeneração estas nossas observações nos permitem formular apenas o conceito de que mielina das bainhas regeneradas parece ter sua origem nos componentes da mielina das bainhas das fibras seccionadas, que se evidencia nas bolas e granulações livres ou fagocitadas pelas células gliais. Estas células participam praticamente da mobilização da mielina como as células de Schwann nos nervos periféricos de acôrdo com os trabalhos de SHAAMBAUGH e FAITH. (20) WEISS e TAYLOR (21) LUSE' (22), WOLMAN (23) e PETER (24), a tal fim lembramos a opinião de vários autores, entre eles LORETI (25) que afirmam ser o oligodendrocito do sistema nervoso central o equivalente da célula Schwann no sistema nervoso periférico desempenhando, entre outras, a função de mobilização da mielina.

A participação das células macrogliais na mobilização da mielina é confirmada pela presença de inclusões que tornam-se menos evidentes a medida que a milinização progride.

Baseados em nossas observações, pode-se afirmar que 10 dias após a secção e colocação de enxerto cruzado na medula dorso-lombar do cão podem ser evidenciados crescimentos e indícios de mielinização dos axônios em regeneração.

A mielina livre é englobada pelos elementos celulares e diminue a medida que aumentam os depósitos de mielina sobre os axônios em regeneração, evidenciando uma participação das células macrogliais no processo de mobilização mielínica.

RESUMO

Os Autores estudando com o método de Lison-Dagnelie a medula dorso-lombar de um cão sacrificado 10 dias após a secção e colocação de enxerto cruzado, afirmam que podem ser evidenciados crescimentos e indícios de mielinização dos axônios em regeneração. E' confirmada a participação das células macrogliais na mobilização da mielina, que diminue nas células a

medida que aumentam os depósitos da mesma sôbre os axônios em regeneração.

SUMMARY

By using the method of Lison-Dagnelie, the authors studied the spinal cord of a dog sacrificed 10 days after its section and realization of a crossed-graft, and affirm that it is possible to show growth and signs of myelinization of the axons in regeneration. It is confirmed the participations of macroglial cells in the mobilization of myeline, which diminishes in the cells at the same time that its deposits grow up on the axons in regeneration.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — KRIMBERG, M. CONTU, P.; SAADI, T.: Pesquisas sobre enxertos de sistema nervoso central (no cão) 1. Observações morfológicas sobre enxertos na medula espinhal dorso-lombar. *Arq. Inst. Anat.*, vol. V, 5-16, 1962.
- 2 — CONTU, P.; KRIMBERG, M.; SAADI, T.: Pesquisas sobre enxertos de sistema nervoso central (no cão) — 2. Observações morfológicas sobre a regeneração de fibras, através de enxertos na medula espinhal dorso-lombar. *Arq. Inst. Anat.* vol. V, 17-63, 1962.
- 3 — WOLLSEY, D.; Minckler, J.; REZENDE, N. and Klemme, R.: Human spinal cord transplant. *Exp. Med. and Surgery* 2 (2): 93-101, 1944.
- 4 — MIGLIAVACCA, A.: La rigenerazione del midolo spinale nei feti e nei neonati. *Boll. Med. — Chir. Paiva* 42: 1147-1151, 1928. Resumo do Biological Abstracts.
- 5 — CRAMER, F. and ALPERS, B. J.: The functions of glia secondary degeneration of the spinal cord: the oligodendroglia as phagocytes. *Arch. Path.* 13: 23-55, 1932. Resumo do Biological Abstracts.
- 6 — SUGAR, O. and Gerard, R. W.: Spinal cord regeneration in the rat. *J. Neurophysiol.* 3:1-19, 1940. Citado em Scott, D. Jr. and Clemente., *Regeneration of spinal cord fibers in the cat.* *J. Comp. Neur.* 1955.
- 7 — BROWN, O. J. and Mc. COUCH, G. P. Abortive regeneration of the transectd spinal cord. *J. Comp. Nevrol.* v. 87 (2): 131-138, 1947.
- 8 — DAVIDOFF, L. M.: and RANSONHOFF, J.: Absence of spinal cord regeneration in the cat. *Jour. Neurophis.* 11: 9-11, 1948.
- 9 — BARNARD, J. and CARPENTER, W.: Lack of regeneration in the spinal cond of the rat. *J. Neurophysiol.* 13: 223-228, 1950.
- 10 — WINDLE, W. and Chambers, W.: Regeneration in the spinal cord of the cat and dog. *Jour. Comp. Neurol.* 93 (2): 241, 257, 1950.
- 11 — FREEMAN, L. W.: Return of function after complete transection of the spinal cord in rat, cat and dog. *Ann. Surg.* 136: 193-205, 1952.
- 12 — WINDLE, W.: CLEMENTE, C.; SCOTT, D. Jr. and CHAMBERS, W. W.: Induction of neuronal Regeneration in the Central Nerves System of animals. *Translactions — Amer. Neurological Assoc. —* 1952.
- 13 — FREEMAN, I. W.; Mc. DOUGALL. j.; TURBES, C. C.

- and BOWMAN, D. E.; The treatment of experimental lesions of the spinal cord of dogs with trypsin (de fotocópia) — 1958.
- 14 — NOBACK, C. R.; BASSET, C. A. and CAMPBELL, J. B.: Regeneration of axons across gaps in the transected spinal cord of adult cats. *A. A. An.* — 1958 April — pág. 349 abstrat 3.
 - 15 — BASSET, C. A. L.; CAMPBELL, J. and Husby, J.: Peripheral nerve and spinal cord regenerations: Factor leading to succes of tubulation tecnique employing Milipore. *Ex. Neurol.* 1: 386-406, 1959.
 - 16 — NOBACK, C. R.; BASSET, C. A. L.; THULIN, C. A.; HUSEBY, J. and CAMPBELL, J.: Cytological similarity in regeneration across gaps in the adult feline spinal cord and peripheral nerve. *Amer. Assoc. Anat.* 1, 2, 3: 317, 1959.
 - 17 — BUNGE, M. B. and Bunge, R. P.: Electron microscopic study of demyelination and remyelination in an experimentally induced lesion in adult spinal cord. *Anat. Rec.* 136 (2): 333, 1960.
 - 18 — OHLWEILER, R. R., e CONTU, P.: Sôbre o uso do método de Lison-Dagnelie no estudo da bainha mielínica. *Arq. Inst. Anat.*, vol. VI, 21, 1963/64.
 - 19 — PERRONCITO, citado em LEVI, G., *trattato de Istologia*, Pag. 861, U.T.E.T., Torino 1954.
 - 20 — SHAMBAUGH, G. Jr. and FAITH, M.: The preblem of regenerating nerves as studied in tissue culture. *Ann. Otol. Rhineol. and Laring.* 72(4): 1124-1134, 1963.
 - 21 — WEISS, P. and TAYLOR, C. A.: Impairment of growth and myelinization in regenerating nerve fibers subiect of constriction. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 55:77-80, 1944.
 - 22 — LUSE, S.A.: Formation of myelin in the Central Nervous System of mice and cats, as studied with the eletron microscope. *Journ. Biophys. and Biochem. Cytol.* 2:777, 783, 1956.
 - 23 — WOLMAN, M.: Study of the early changes ecurring in degenerating myelin. *Neurobiology* 6:636-639, 1956.
 - 24 — Peters, A.: The formation and structure of myelin sheaths in Central Nervous system. *Journ. Biophys. and Biochem. Cytol.* 8:431-446, 1960.
 - 25 — LORETI, F.: Configurazione dell'oligodendroglia interfascicolare e sua omologia con la cellula di Schwann. *Rev. Pat. Nerv. e Ment.*, 52:135, 1938.