

NICHOS DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E RESPOSTA INFLAMATÓRIA A DIFERENTES PRÓTESES SINTÉTICAS NA PAREDE ABDOMINAL DE RATOS COM HÉRNIAS INCISIONAIS

Stem cells hematopoietic niches and inflammatory response to different synthetic prosthesis implanted in rat with incisional hernias

Renato Lamounier **BARBIERI**¹, Suely de Fátima **PARREIRA**¹, Sarah do Valle **STUDART**¹,
Aline Riquena **DA-SILVA**¹, Ivone da Silva **DUARTE**¹, Pedro Luiz Squilacci **LEME**¹

Trabalho realizado no ¹Curso de Medicina, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO - Racional: A hematopoiese extramedular depende de mecanismos fisiopatológicos complexos, havendo relação destas células-tronco hematopoéticas com proteínas mediadoras da inflamação. A identificação de células hematopoéticas fora da medula óssea no adulto, situação que ocasionalmente pode acompanhar a resposta inflamatória era considerada ocorrência secundária, mas estudos biomoleculares modificaram este conceito. **Objetivo:** Descrever agrupamentos de células precursoras das plaquetas (megacariócitos) e células da resposta inflamatória, na parede abdominal e no baço de ratos com hérnias incisionais induzidas experimentalmente e reparadas com diferentes próteses sintéticas. **Métodos:** Vinte e cinco ratos com hérnias incisionais previamente realizadas foram distribuídos em grupos com cinco animais: Grupo 1, reparo do defeito herniário sem implante de prótese; Grupo 2, reparo com prótese de polipropileno; Grupo 3, reparo empregando polipropileno com baixa gramatura; Grupo 4, utilização de prótese de polipropileno e poliglicaprone; Grupo 5, prótese de polipropileno e poliglactina. Todas as próteses foram recortadas na forma de losangos com área de 2,625 cm². Os animais foram reoperados após 10 dias, as paredes abdominais foram retiradas em bloco com as vísceras a elas aderidas e o material foi processado em rotina histológica. **Resultados:** Foram evidenciados nichos de megacariócitos na parede abdominal e no baço coletado juntamente com as aderências em animais com implante de próteses, além de reação inflamatória significativa. **Conclusão:** A intensa reação inflamatória, local e sistêmica em relação às próteses com polipropileno em sua composição, foi desproporcional à resposta esperada, requerendo aprofundamento do estudo com avaliação da imunofenotipagem e painéis específicos de anticorpos monoclonais para melhor esclarecimento.

DESCRIPTORIOS - Hérnia incisional. Células-tronco. Hematopoiese extramedular. Telas cirúrgicas. Efeitos adversos.

Correspondência:

Pedro Luiz Squilacci Leme
E-mail: gorableme@uol.com.br;
dplassociados@terra.com.br

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 22/01/2017
Aceito para publicação: 11/04/2017

HEADINGS - Abdominal wall. Hernia, ventral. Hematopoietic stem cells. Surgical mesh. Adverse effects

ABSTRACT - Background: Extramedullary hematopoiesis depends on complex pathophysiological mechanisms linked to hematopoietic stem cells and the proteins considered mediators of the inflammation. The identification of hematopoietic cells outside bone marrow in the adult is an occurrence that can occasionally follow the inflammatory response, was considered a secondary occurrence, but current biomolecular studies have changed that concept. **Aim:** Describe the presence of clusters of precursor cells of platelets (megakaryocytes), and cells of the inflammatory response in the abdominal wall and spleen of rats with experimentally induced incisional hernias and repaired with different synthetic prostheses. **Methods:** Twenty-five rats with incisional hernias previously performed, were divided into groups of five animals each: Group 1, repair of the hernia defect without prosthetic implant; Group 2, repair with polypropylene prosthesis; Group 3, repair using polypropylene with low weight; Group 4, the use of polypropylene and polyglycaprone prosthesis; Group 5, of polypropylene and polyglactin prosthesis. All prostheses were cut in rhombus format with area 2,625 cm². The animals were reoperated after 10 days, the abdominal walls were removed with the viscera attached to them and the material was processed for histological study. **Results:** Megakaryocyte niches in the abdominal wall and spleen, occasionally removed together with the adhesions produced in animals with implantation of prostheses and significant inflammatory reaction. **Conclusion:** The intense inflammatory reaction due to the prostheses with polypropylene in their composition was disproportionate to the expected response, indicating that further studies should be accomplished including immunophenotyping evaluation and specific panels of monoclonal antibodies to better understand the findings.

INTRODUÇÃO

Na vida intrauterina os hemangioblastos do mesoderma do saco vitelino apresentam capacidade de diferenciação hematopoética e vascular, originando os primeiros vasos sanguíneos e os hemocitoblastos, em função das necessidades do embrião por nutrientes e oxigênio da circulação materna. Células mesenquimais (angioblastos) formam ilhotas sanguíneas e os espaços dentro destas ilhotas originam um endotélio primitivo, com células que vão se diferenciar em células sanguíneas; estes fenômenos começam no fígado, depois no baço, medula óssea e linfonodos. Embora

as primeiras células sanguíneas e o plasma se originem com os vasos do saco vitelino e alantóide, o sangue só é identificado depois do segundo mês de desenvolvimento embrionário⁶.

Nos sacos vitelinos podem ser encontradas células hematopoéticas com grande capacidade de diferenciação, como as precursoras dos monócitos e dos megacariócitos. Após o nascimento, em condições normais, a hematopoiese dos eritrócitos, granulócitos e plaquetas ocorre na medula óssea; os linfócitos são formados principalmente no tecido linfóide (linfonodos, baço, timo e tecido linfóide das mucosas), mas esta função pode ser assumida por outros órgãos, tanto em situações que acompanham doenças benignas quanto malignas^{10,13,14,21}.

O aparecimento de agrupamentos de células sanguíneas fora da medula óssea, no adulto recebe o nome de hematopoiese extramedular, podendo formar nódulos que podem ser identificados inclusive durante a realização de métodos de imagem de rotina^{17,18}. Esta situação, que em princípio era considerada secundária e sem maior importância, com os estudos biomoleculares deixou de ser avaliada como incidental, surgindo o conceito das células-tronco em seu microambiente (nichos de células-tronco). O desenvolvimento destas células nos tecidos, e não na medula óssea, implica no retorno a padrões embriológicos de hematopoiese, com reativação de nichos de células-tronco e participação da matriz extracelular, de células estromais, assim como de quimiocinas, representando um processo complexo de resposta do organismo a situações adversas, ainda pouco compreendido em mamíferos^{8,10,13,26,30}.

O processo inflamatório e a resposta imune decorrentes da reparação dos tecidos, com o aparecimento de células com capacidade antigênica e fagocitária, são fatores desencadeantes, ocorrendo hematopoiese de todas as linhagens de células sanguíneas, principalmente no baço e no fígado. Os fenômenos que acompanham o processo inflamatório se iniciam na microcirculação, devido inicialmente a mediadores químicos primários que agem nas arteríolas, assim como a mediadores químicos secundários, liberados durante a resposta celular à inflamação. A abertura dos esfíncteres capilares por ação de catabólitos, íons Hidrogênio e mediadores químicos provoca aumento da permeabilidade vascular e hiperemia, com extravasamento de líquido rico em albumina plasmática, resultando em hemoconcentração, agregação das hemácias, aumento da viscosidade sanguínea e hipóxia local. O endotélio também sofre alterações, havendo agregação de plaquetas com ocorrência de trombos. Na fase aguda inicia-se a resposta dos leucócitos, que passam a marginar a parede dos vasos e a estase na circulação leva à saída de hemácias do leito vascular, ocorrendo diapedese e migração de neutrófilos para o tecido conjuntivo da região inflamada^{10,14,20,28}.

O reparo das grandes hérnias incisionais implica em extensas áreas de dissecação, com agressão significativa a tecidos fibróticos e cicatriciais, assim como no emprego de próteses sintéticas. O polipropileno é utilizado desde os estudos pioneiros de Usher em 1958 e várias opções têm sido desenvolvidas com o intuito de diminuir a reação inflamatória ao implante, como a diminuição da gramatura do material utilizado ou a associação de outros materiais absorvíveis a um arcabouço com menor quantidade de polipropileno, mas a resposta inflamatória desencadeada e as aderências ainda são significativas, mesmo com diferentes materiais disponíveis atualmente^{2,3,11,16,22,25,29}.

O objetivo deste estudo foi descrever agrupamentos de células precursoras das plaquetas (megacariócitos) e células da resposta inflamatória, na parede abdominal e no baço de ratos com hérnias incisionais induzidas experimentalmente e reparadas com diferentes próteses sintéticas.

MÉTODOS

Este experimento foi realizado na Universidade Nove de

Julho, São Paulo, após autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo AN 0034/13). As normas gerais para pesquisa experimental no Laboratório de Habilidades Cirúrgicas Avançadas da instituição são rigorosamente supervisionadas e respeitam os preceitos de "uso racional dos animais de experimentação"¹⁵; cumprindo a Lei Federal nº 11.794 de outubro de 2008 e o Decreto nº 6.689, de julho de 2009, que a regulamenta. Todos os animais receberam indução anestésica antes dos procedimentos operatórios e antes da morte, assim como os cuidados gerais, alimentação, antibioticoterapia e analgesia padronizadas para o período pós-operatório.

Vinte e cinco ratos (*Rattus Norvegicus*, var. *Albinus*, *Rodentia Mammalia*) da linhagem Wistar, geneticamente semelhantes, apresentam linhagem isogênica e resultados confiáveis em estudos com pequeno número de animais^{4,24}; eles foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos com cinco animais cada; antes das operações permaneceram em gaiolas individuais com acesso a água e ração padronizada *ad libitum*, mantidos em temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 h. Os animais, com peso médio de 339 g foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), sendo realizada uma incisão mediana com 4 cm de extensão, abertura da cavidade abdominal na linha alba medindo 3,5 cm e foi confeccionado um ponto de sutura no terço médio de cada lado da incisão, evertendo as bordas do músculo reto abdominal, sem englobar o peritônio, criando assim um defeito com 3,5x1,5 cm. A primeira fase do experimento terminava com sutura de fio de náilon 5-0 apenas da pele dos animais, que eram devolvidos ao biotério e observados por 10 dias, correspondendo à primeira fase do experimento.

No décimo dia após a operação inicial eles foram reoperados para avaliar as hérnias incisionais e as aderências formadas inicialmente^{2,25}. Desfeitas estas aderências, em cada um dos grupos com cinco animais foi realizado um dos seguintes procedimentos: no Grupo 1, aproximação simples das bordas do orifício herniário com chuleio simples utilizando fio de poliglactina 910 número 5-0, sem implante de prótese; no Grupo 2 o defeito herniário foi reparado com prótese de polipropileno suturada às bordas, opção considerada referência para a maior reação inflamatória esperada; no Grupo 3 foi empregado o polipropileno com baixa gramatura; no Grupo 4, prótese de polipropileno e poliglecaprone; e no Grupo 5 polipropileno e poliglactina. As quatro diferentes próteses sintéticas foram doadas para evitar conflitos de interesse, recortadas na forma de losangos com 3,5x1,5 cm, correspondendo à área de 2,625 cm² e fixadas às bordas dos orifícios herniários com fio de poliglactina 910. Após os procedimentos propostos para cada um dos grupos, a operação foi finalizada com sutura da pele com fio de náilon 5-0 e os animais foram observados por mais 10 dias (Figura 1).

Após mais um período de 10 dias, os animais foram reoperados para retirada das paredes abdominais anteriores em bloco, com eventuais órgãos aderidos às próteses, permitindo a avaliação macroscópica. As peças obtidas foram preservadas em formalina a 10% por 24 h e depois desidratadas com etanol em concentrações progressivas, diafanizadas com xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados com 5 µm, corados com H&E. As lâminas resultantes foram fotografadas com o auxílio de microscópio óptico com objetivas de 4, 10, 20 e 40x, assim como ocular de 10x, proporcionando resolução detalhada de 40, 100, 200 e 400x, equivalente a 20, 50, 100 e 200 µm respectivamente.

RESULTADOS

Ocorreram aderências de diferentes estruturas abdominais à parede suturada e às próteses implantadas em todos os grupos estudados, assim como reação inflamatória sugerida por

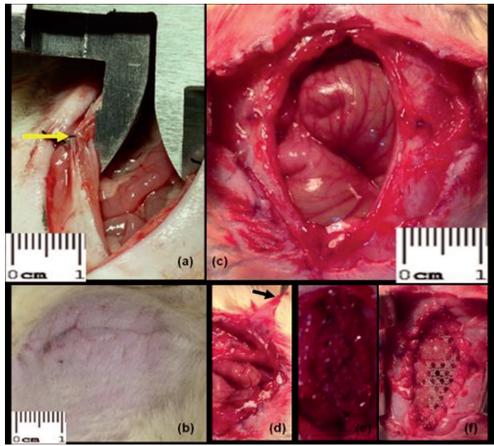


FIGURA 1 - Primeira fase do experimento: A) ponto evertente (seta) no terço médio da incisão, sem englobar o peritônio, para realizar o defeito herniário; B e C) hérnia e orifício herniário resultantes após dez dias de observação; D) saco herniário (seta). Segunda fase do experimento: E e F) diferentes próteses suturadas às bordas do defeito herniário no 10º dia após a primeira operação

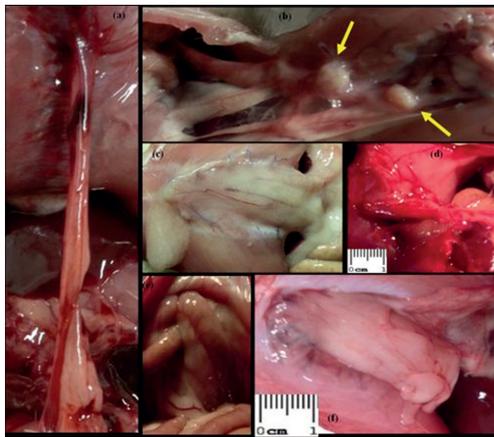


FIGURA 2 - Reoperação dez dias após o reparo dos defeitos herniários: A) Grupo 1 (sem prótese): aderência do omento à incisão; B e C) Grupo 2 (polipropileno): granulomas de corpo estranho (setas) e aderências do omento maior; D) Grupo 3 (polipropileno de baixa gramatura): intensa vascularização e aderências firmes sobre a prótese; E) Grupo 4 (polipropileno e poliglecaprone): aderências do intestino delgado; F) Grupo 5 (polipropileno e poliglecatina): prótese recoberta pelo omento maior.

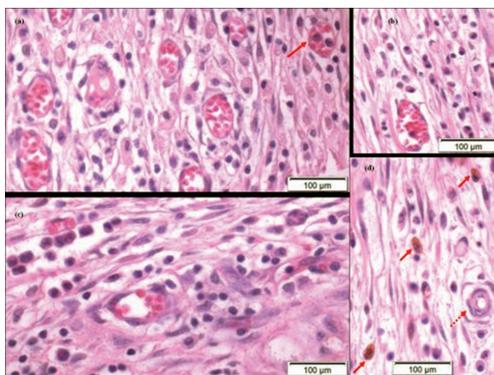


FIGURA 3 - A, B e C) Grande quantidade de vasos sanguíneos congestionados, granulócitos na luz de um vaso (seta) e infiltrado inflamatório; D) hemosiderina fagocitada, permitindo a identificação de macrófagos (setas) e arteríola (seta tracejada) H&E 200x

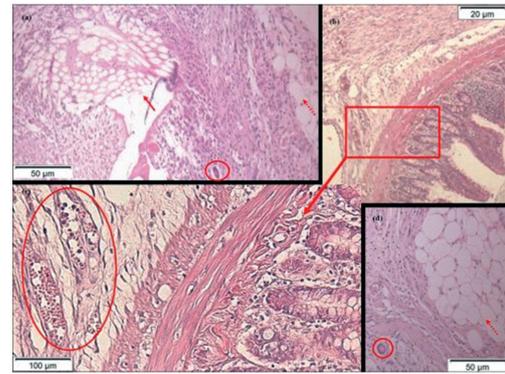


FIGURA 4 - Cortes histológicas coradas pela H&E com aderências e reação inflamatória ao material de implante: A) 100x, local onde se encontrava a prótese de polipropileno (seta), aderência do omento maior (seta tracejada) e célula gigante de corpo estranho (detalhe); B) 40x e C) destaque - 200x, aderência do intestino delgado à parede abdominal, vasos congestionados com granulócitos em seu interior (detalhe); D) 100x, aderência do omento maior (seta tracejada) à parede abdominal e célula gigante de corpo estranho (detalhe).

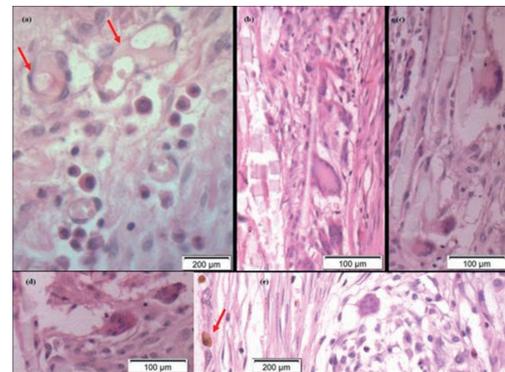


FIGURA 5 - Cortes histológicas coradas pela H&E com reação inflamatória ao material de implante: A) 400x, intensa resposta inflamatória e células gigantes englobando material inerte (setas); B, C e D) 200x, reação granulomatosa ao material de implante, com células gigantes de corpo estranho; E) 400x, reação inflamatória, célula gigante e hemosiderina fagocitada no citoplasma de macrófago (seta)

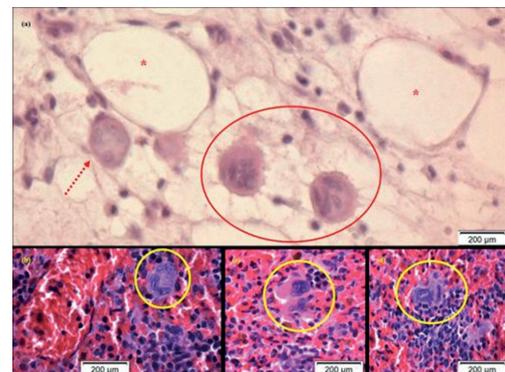


FIGURA 6 - Cortes histológicas coradas pela H&E 400x: A) célula gigante (seta tracejada) e nicho com células precursoras das plaquetas (megacariócitos), com núcleos lobulados e prolongamentos citoplasmáticos (destaque), próximas a vasos linfáticos (*) do omento maior, aderido à parede abdominal, de animal com implante de prótese de polipropileno de baixa gramatura; B, C e D) megacariócitos (destaques) em baços, inferindo estímulo sistêmico do material implantado na parede abdominal

vascularização intensa e presença de granulomas macroscópicos, evidenciados na reoperação, realizada após 10 dias para retirada em bloco da parede abdominal e das estruturas e órgãos a ela aderidos (Figura 2).

A análise histológica evidenciou intensa resposta celular no tecido conjuntivo próximo ao local dos implantes, neovascularização e vasos com muitas hemácias em seu interior (Figura 3). Morfologicamente, a luz dos capilares apresenta uma camada endotelial, as vênulas possuem diâmetro semelhante ao dos capilares, mas com algumas células musculares em suas paredes e nas arteríolas típicas, a espessura da camada de células musculares lisas é semelhante ao diâmetro da luz do vaso; estas estruturas foram encontradas em vários campos microscópicos, assim como células mesenquimais indiferenciadas perivasculares (pericitos), que podem originar outras células do tecido conjuntivo, com seus núcleos alongados e cromatina condensada, situando-se principalmente na adjacência dos capilares.

Aderências firmes entre o omento maior, intestino delgado, baço e fígado com a parede abdominal e as próteses implantadas foram encontradas com frequência. Houve intensa migração de granulócitos, sendo evidenciados polimorfonucleares, eosinófilos com grânulos citoplasmáticos acidófilos; linfócitos típicos com citoplasma escasso, núcleo arredondado e escuro; plasmócitos, que produzem anticorpos, denotando resposta imunológica significativa, com núcleos arredondados e excêntricos característicos. Vários macrófagos, com hemosiderina fagocitada em seu citoplasma, sugerindo hemorragia próxima ao local avaliado, assim como muitas células gigantes de corpo estranho fagocitando material inerte e restos celulares foram identificadas (Figuras 3 e 4).

Granulomas podem ser evidenciados em algumas inflamações crônicas, são formados por agrupamentos de células de defesa e ocasionalmente podem ser identificados macroscopicamente (Figura 2). São formados principalmente por linfócitos, plasmócitos, histiócitos e monócitos, contendo muitas células gigantes, com ou sem sinais de necrose. Os granulomas de corpo estranho podem se desenvolver em resposta a agente com baixa atividade imunogênica, como ocorre com os materiais inertes não digeríveis. Muitas células de Langhans típicas, com núcleos periféricos dispostos na forma de ferradura foram identificadas (Figura 5).

Células com características histológicas de megacariócitos formando nichos foram identificadas no omento maior e em baços, eventualmente aderidos à parede abdominal, que também foram processados para estudo histológico (Figura 6). A presença destas células hematopoiéticas fora da medula óssea e a volta de padrões embriológicos de hematopoiese no baço inferem a intensidade da reação inflamatória observada neste experimento.

DISCUSSÃO

Os tecidos conjuntivos, originados do mesênquima, são ricos em vasos sanguíneos, células fagocitárias e produtoras de anticorpos, assim como fibras colágenas e elásticas; suas células mais comuns são os fibroblastos (células jovens) e fibrócitos (células maduras). No conjuntivo normal aparecem também eosinófilos e linfócitos, células pouco diferenciadas que podem originar plasmócitos e macrófagos (denominados histiócitos quando fixos nos tecidos), que fagocitam agentes agressores, restos celulares, partículas inertes e podem formar células gigantes de corpo estranho^{3,12,27}.

Os fenômenos exsudativos são característicos às inflamações, ocorrendo aumento da permeabilidade vascular, edema inflamatório e liberação de mediadores químicos; os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o foco inflamatório, favorecendo a liberação de mediadores químicos secundários; com a evolução do quadro, fibroblastos e células do endotélio

dos capilares também tentam reparar as lesões. A fagocitose é um dos mecanismos de defesa mais importantes do organismo; quando há cronificação do processo, os macrófagos tornam-se volumosos, com grande atividade fagocitária, e nas inflamações crônicas granulomatosas tendem a se agrupar, adquirindo aspecto epitelióide, surgindo células gigantes plurinucleadas^{3,5,6,27,28}.

Os monócitos que migram do sangue dão origem aos macrófagos no foco inflamatório, especialmente quando há tecido de granulação. A ação dos fibroblastos é fundamental para a reparação dos tecidos e a neoformação conjuntivo-vascular é característica dos processos crônicos. Plasmócitos se diferenciam dos linfócitos B e monócitos aumentam sua atividade fagocitária pela ação dos linfócitos T, formando grupos celulares compactos^{12,19}.

As células de Langhans apresentam núcleos pequenos e semelhantes em sua periferia, conferindo-lhes aspecto de ferradura, com diâmetro de até 100 μm ; quando formadas em resposta a corpos estranhos não digeríveis apresentam-se irregulares, podendo atingir cerca de 300 μm ^{12,19,26,28}. Foram evidenciados macroscopicamente granulomas e encontradas muitas células com estas características neste estudo.

A hipersensibilidade a um produto não degradável resulta de relação complexa entre os antígenos do elemento estranho ao organismo, ativação prolongada de macrófagos, resposta das células *T helper* e hiperatividade das células B, com circulação de imunocomplexos e mediadores químicos biológicos, havendo intensa atividade de enzimas, citocinas, expressão dos complexos de histocompatibilidade e linfócitos CD4+Th1; estas células induzem a liberação de interleucina-1 dos macrófagos e fatores quimiotáticos, resultando nos granulomas^{3,12,19,24,26,28}. Sinais de reação inflamatória intensa foram evidenciados em todos os animais avaliados, que apresentaram tecido de granulação, graus variados de angiogênese e fibrose, surgiram vasos sanguíneos com endotélio fino, repletos de hemácias, tecido conjuntivo de suporte com grande quantidade de fibroblastos, e formação de muitos granulomas, denotando resposta inflamatória desproporcional à esperada ao material sintético implantado neste experimento.

O omento é formado por uma estrutura trabecular, com vasos sanguíneos e tecido adiposo, sendo considerado um órgão endócrino que secreta citocinas, com grande capacidade funcional. Sua estrutura o classifica como órgão linforeticular, rico em arteríolas, vênulas, linfócitos, células mesoteliais e endoteliais, macrófagos, monócitos, granulócitos, fibroblastos e adipócitos, possuindo capacidade angiogênica; células-tronco já foram isoladas neste tecido, classicamente associado à defesa do abdome contra infecções ou prevenção de algumas complicações de aderências induzidas por manipulação operatória ou implantes sintéticos^{2,3,23,25}. O omento foi a estrutura abdominal que mais recobriu o material de implante utilizado, sendo propício à implantação do nicho de megacariócitos identificado no estudo descrito.

O baço é órgão linfóide interposto na circulação sanguínea, apresenta uma cápsula de tecido conjuntivo denso que forma trabéculas e possui escassas fibras musculares lisas, nele são formados principalmente monócitos e linfócitos, assim como suas células fagocitárias agem contra agentes agressores, mesmo sendo inertes, que se acumulam em seus macrófagos. As fibras reticulares são importantes para o arcabouço do órgão e sua estrutura é dividida em polpa branca, contendo linfócitos em vários estágios de maturação, e polpa vermelha, formada pelos cordões de Billroth, com seus sinusóides (seios esplênicos), repletos de sangue e revestidos por células fagocitárias alongadas, que realizam hemocaterese, fagocitando as hemácias que se fragmentam²⁶.

Células reticulares, macrófagos e linfócitos ocupam a faixa de tecido linfóide entre a polpa vermelha e os nódulos linfáticos, região onde ficam retidos os antígenos que desencadeiam resposta imunológica; nos cordões de Billroth, podem ser evidenciadas células reticulares primitivas, macrófagos fixos

e móveis, linfócitos, plasmócitos, eritrócitos, plaquetas e granulócitos. Os ramos da artéria esplênica na polpa branca são envolvidos por uma bainha formada por linfócitos T, que se espessa formando nódulos onde predominam linfócitos B. Arteriolas terminais atingem a polpa vermelha e em seu endotélio e lâmina basal podem ser identificadas células fagocitárias, células adventícias (células mesenquimais indiferenciadas), assim como os linfócitos, apresentando grande atividade na resposta imunológica^{6,19,26}.

O baço apresenta função hematopoiética em fetos humanos após a metade da gestação, persistindo certa atividade residual no período neonatal, que logo desaparece. Os megacariócitos surgem no período inicial da hematopoiese embrionária, no fígado, baço e timo, seu número diminui após a metade do período de vida intrauterina, mas persistem por algumas semanas após o nascimento, quando o baço passa a produzir principalmente as células da série vermelha do sangue^{6,13}. No baço normal do adulto podem ser encontrados elementos hematopoiéticos maduros, derivados de células-tronco circulantes, que lá completam sua diferenciação²¹.

A medula óssea contém muitas células derivadas de células-tronco mesenquimais, representadas por fibroblastos, adipócitos, condrócitos, osteoblastos, células endoteliais e vasculares, incluindo as células mesenquimais perivasculares (pericitos). Em mamíferos sua arquitetura envolve nichos de células-tronco hematopoiéticas, capazes de autorregeneração e diferenciação em diferentes linhagens celulares. O conceito de nicho e a regulação *in vivo* do seu microambiente permanecem pouco conhecidos, uma vez que os estudos a respeito foram realizados basicamente *in vitro*^{6,8,9,10,13,19,30}. A hematopoiese se faz de forma complexa pela diferenciação de células-tronco, principalmente nos nichos hematopoiéticos; em condições habituais estas células permanecem inativas na medula óssea pela baixa concentração de oxigênio, este equilíbrio envolve quimiocinas e vias moleculares ainda pouco compreendidas¹⁴.

Quando ocorrem alterações no microambiente da medula óssea, há liberação de células precursoras da hematopoiese na circulação periférica, que no baço encontram condições similares para desenvolverem suas linhagens celulares. A presença de megacariócitos nesta localização pode ser considerada uma displasia, uma vez que ocorrem alterações morfológicas importantes destas células, com aumento anormal do núcleo e de sua lobulação²¹.

A hematopoiese pode ocorrer fora da medula óssea sempre que a interação entre fatores sistêmicos, o microambiente de determinado tecido e um nicho de células-tronco permita sua reativação, basicamente em situações onde há falência da medula óssea (mielofibrose, mielodisplasia, toxicidade por drogas, radiação, infecção, neoplasias, doenças autoimunes); mieloestimulação significativa (necessidade de produção de células sanguíneas em doenças inflamatórias e hematológicas); inflamação e reparação, assim como na produção anormal de quimiocinas^{13,14}. Classicamente associada com alterações mieloproliferativas ou mielodisplásicas, no baço a hematopoiese extramedular, relacionada ou não às neoplasias, pode surgir em situações reacionais, embora esta diferenciação seja difícil sem o auxílio da imunistoquímica²¹.

Ocorrendo inflamação, próximo dos capilares podem ser encontradas células mesenquimais indiferenciadas perivasculares (pericitos), que se assemelham aos fibroblastos e macrófagos fixos, podendo também se diferenciar em outras células do tecido conjuntivo. O papel dessas células, em situações adversas, envolve múltiplos fatores celulares e extracelulares que ainda são estudados^{6,10,13,28,30}. O conceito de nicho vascular é relativamente novo, e está associado ao endotélio sinusoidal da medula óssea e do baço, mas os fatores que o estabelecem ainda não são bem conhecidos. A ativação de células multipotentes, incluindo os precursores dos megacariócitos, envolve células adjacentes ao endotélio sinusoidal para estabelecer e sustentar a atividade hematopoiética extramedular no baço e em outros tecidos.

Nas neoplasias, o endotélio dos vasos funciona como uma extensão dos nichos vasculares da medula óssea, possibilitando a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas em vários tecidos, fenômeno que é facilitado pela liberação de fatores pelas células endoteliais e possivelmente pelos macrófagos. Precursores das células hematopoiéticas também podem ser encontrados nos vasos adjacentes às células endoteliais do baço, músculo esquelético, intestino delgado e tecido adiposo; muitos desses tecidos são considerados pontos de hematopoiese extramedular em animais adultos¹³. O desdobramento desta pesquisa pretende avaliar as células indiferenciadas perivasculares, uma vez que neste experimento foi evidenciada intensa neovascularização nos tecidos próximos ao material implantado.

Quando há hematopoiese extramedular secundária à mieloestimulação, ocorre reativação de locais embrionários de hematopoiese, principalmente no baço e fígado, mas algumas vezes em outros tecidos, como uma resposta homeostática natural em infecções, doenças inflamatórias, autoimunes e hematológicas^{13,14}. Esta condição foi descrita como achado incidental em estudos histológicos de rotina até de baços retirados após lesão traumática^{1,21}, em biópsias de fígados transplantados, após transplante de medula óssea, na púrpura trombocitopênica, síndrome hemolítico-urêmica, em doenças que cursam com hemólise, infarto esplênico e na esplenomegalia fibrocongestiva^{13,21}. Além das anemias hemolíticas, a hipóxia causada por hemorragias significativas estimula a maturação de precursores eritrocitários¹³. Em doenças como anemia falciforme, talassemia e esferocitose hereditária podem surgir massas paravertebrais de aspecto nodular próximas do canal medular, com comprometimento da cavidade torácica e abdominal^{13,17,18}.

O camundongo e o rato adulto preservam alguma atividade hematopoiética no baço e no fígado. Em animais este achado pode ser considerado incidental, mas também interpretado como indicador inicial de doença hematológica. Quando há estímulo à resposta imune ou infecções em mamíferos e roedores, pode ser encontrada hematopoiese nos pulmões, rins e cavidade peritoneal, além do fígado e baço¹³.

A ocorrência de neoplasias, tanto primárias como a leucemia aguda LMA-M7, um subtipo raro originada a partir de megacariócitos primitivos⁹, como a possibilidade do surgimento de lesões tumorais associadas à infecção crônica, representam vasto campo de pesquisa. Barbosa *et al.*²⁵, estudando a histopatologia do saco herniário, descreveram o infiltrado inflamatório encontrado no peritônio e mesentério, com proliferação vascular de aspecto angiomatóide ou hamartomatoso, grande quantidade de monócitos, linfócitos, macrófagos e reação inflamatória inadequada, além de hiperplasia mesotelial que pode ser confundida com mesotelioma; os autores também teceram críticas ao uso indiscriminado de próteses sintéticas. Birolini *et al.*⁷ descreveram carcinomas de células escamosas juntamente com a infecção crônica que pode complicar o implante de próteses na parede abdominal para o reparo de hérnias incisionais, relatando o potencial de carcinogênese desta situação. Os nichos de megacariócitos em localização atípica evidenciados neste experimento podem ser considerados displasia²¹, indicando que a continuação do estudo pode encontrar resultados interessantes.

Existem diferenças significativas que dificultam a identificação correta de algumas células, que necessitam colorações especiais para serem evidenciadas adequadamente. Os corantes utilizados em esfregaços de medula óssea são diferentes da H&E dos cortes histológicos habituais. A medula óssea, em resposta à liberação continuada de citocinas, apresenta aumento das fibras de reticulina, que podem ser evidenciadas com outra coloração clássica, o picrossírius¹¹. Muitas vezes a imunofenotipagem é essencial para o diagnóstico diferencial e avaliação da linhagem megacariocítica, uma vez que as células hematopoiéticas apresentam vários antígenos; a imunofenotipagem por citometria de fluxo pode identificar vários antígenos utilizando anticorpos monoclonais específicos, que recebem a denominação de "clusters

of differentiation" (CD), seguida de um número. Os antígenos mais importantes para identificação da linhagem megacariocítica são o CD41a, CD42b (nas fases de megacarioblastos) e CD61 (durante o amadurecimento megacariocítico)^{9,21,27}, que serão estudados com o desdobramento do estudo agora apresentado.

Serigiolle *et al.*²⁵ demonstraram que este modelo experimental de implante de diferentes próteses em defeito herniário previamente induzido, apresenta percentagem alta de aderências, concluindo que não é o mais adequado para a avaliação de graus de aderências. Houve resposta inflamatória intensa e desproporcional à esperada aos biomateriais implantados, sugerindo que o estudo deve ser aprofundado, com avaliação da imunofenotipagem e anticorpos monoclonais para confirmação destes achados.

A intensa neovascularização encontrada próximo dos locais de implante das próteses, a grande quantidade de macrófagos²⁷ com hemosiderina fagocitada em seu citoplasma, e células perivasculares parecem ter relação com a identificação do nicho de megacariócitos no omento aderido à parede abdominal do rato, assim como a presença de megacariócitos no baço, inferindo resposta sistêmica, indicam que os parâmetros analisados no experimento devem ser ampliados.

CONCLUSÃO

Todos os animais estudados apresentaram formação de aderência fibrosa, neovascularização, granulomas e a presença de células mesenquimais. Foram observadas respostas celulares à inflamação que, embora possíveis, foram pouco usuais, como a presença de megacariócitos evidenciados na parede abdominal e no baço, indicando necessidade de abordagens posteriores com diferentes técnicas para melhor identificar e quantificar as linhagens celulares envolvidas.

REFERÊNCIAS

- Al-Kindi H, Devi L, George M. Splenic pathology in traumatic rupture of the spleen: a five year study. *Oman Med J* 2009; 24(2): 81-3.
- Aramayo ALG, Lopes-Filho GJ, Barbosa CA, Amaral VF, Costa LA. Abdominal wall healing in incisional hernia using different biomaterials in rabbits. *Acta Cir Bras* 2013;28(4):307-16.
- Araújo-Filho I, Honorato-Sobrinho AA, Rego AC, Garcia AC, Fernandes DP, Cruz TM, et al. Influence of laparoscopy and laparotomy on gasometry, leukocytes and cytokines in a rat abdominal sepsis model. *Acta Cir Bras* 2006; 21(2): 74-9.
- Araujo LMG, Serigiolle LC, Gomes HMP, Rodrigues DAB, Lopes CM, Leme PLS. Volume calculation of rats' organs and its application in the validation of the volume relation between the abdominal cavity and the hernial sac in incisional hernias with "loss of abdominal domain". *Arq Bras Cir Dig* 2014; 27(2): 177-81.
- Barbosa CA, Amaral VF, Lázaro-da-Silva A. Histopatologia do saco herniário da hérnia inguinal indireta e do peritônio parietal em adultos e crianças: estudo qualitativo da sua musculatura lisa. *Rev Col Bras Cir* 2000; 27(3): 183-8.
- Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 2005; 7(4): 452-64.
- Birolini C, Minossi JG, Lima CF, Utiyama EM, Rasslan S. Mesh cancer: long-term mesh infection leading to squamous-cell carcinoma of the abdominal wall. *Hernia* 2014; 18:897-901.
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425: 841-6.
- Farias MG, Biermann MB. Análise morfológica, imunofenotípica e molecular na identificação da leucemia megacariocítica aguda (LMA-M7). *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29(4): 387-93.
- Garrett RW, Emerson SG. Bone and blood vessels: the hard and the soft of hematopoietic stem cell niches. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 503-6.
- Isa AC, Matias JEF, Yamamoto CT, Isa RH, Campos ACL, Coelho JCU. Emprego de telas cirúrgicas de diferentes composições na correção de defeito da parede abdominal de ratos. *Rev Col Bras Cir* 2015;42(5):329-36.
- James DG. A clinicopathological classification of granulomatous disorders. *Postgrad Med J* 2000; 76: 457-65.
- Johns JL, Christopher MM. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. *Veterin Pathol* 2012; 49(3): 508-23.
- Kim CH. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J Blood Med* 2010; 1: 13-9.
- Kinshoku MR, Rodriguez CAL, Fidalgo RS, Duran CCG, Leme PLS, Duarte IS. Uso racional de modelos animais para pesquisa e ensino de microcirurgia. *Rev Col Bras Cir* 2012; 39(5): 414-7.
- Lamber B, Grossi JVM, Manna BB, Montes JHM, Bigolin AV, Cavazzola LT. Pode a tela de poliéster coberta com colágeno diminuir as taxas aderências intraperitoneais na correção de hérnia incisional? *Arq Bras Cir Dig* 2013; 26(1):13-7.
- Marchiori E, Escussato DL, Irion KL, Zanetti G, Rodrigues RS, Meirelles GSP, et al. Hematopoiese extramedular: achado sem tomografia computadorizada do tórax de 6 pacientes. *J Bras Pneumol* 2008; 34(10): 812-6.
- Moreira LBM, Melo ASA, Marchiori E. Hematopoiese extramedular intratorácica: relato de um caso. *Radiol Bras* 2001; 34(3): 177-80.
- Murakami M, Hirano T. A four-step model for the IL-6 amplifier, a regulator of chronic inflammations in tissue-specific MHC class II-associated autoimmune diseases. *Front Immunol* 2011; 2: 1-8.
- Murakami M, Hirano T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. *Front Immunol* 2012; 3: 323-4.
- O'Malley DP, Kim YS, Perkins SL, Baldrige LA, Juliar BE, Orazi A. Morphologic and immunohistochemical evaluation of splenic hematopoietic proliferations in neoplastic and benign disorders. *Modern Pathol* 2005; 18: 1550-61.
- Pundek MRZ, Czecko NG, Yamamoto CT, Pizzatto RF, Czecko LEA, Dietz UA, Malafaia O. Estudo das telas cirúrgicas de polipropileno/poliglicaprono e de polipropileno/polidioxanona/celulose oxidada regenerada na cicatrização de defeito produzido na parede abdominal de ratos. *Arq Bras Cir Dig* 2010; 23(2): 94-9.
- Rafael H. Aplicación clínica del epiplón en el sistema nervioso central. *Acta Méd Peruana* 2008; 25(3): 176-180.
- Ricciardi BF, Chequim LH, Gama RR, Hassegawa L. Correção de hérnia abdominal com tela envolta por tecido fibroso - estudo em ratos Wistar. *Rev Col Bras Cir* 2012;39(3):195-200.
- Serigiolle LC, Barbieri RL, Gomes HMP, Rodrigues DAB, Studart SV, Leme PLS. Critical analysis of experimental model for study of adhesions after incisional hernias induced in rats and repair of abdominal wall with different biomaterials. *Arq Bras Cir Dig* 2015; 28(3): 178-82.
- Steiniger B, Barth P, Hellinger A. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp. Do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am J Pathol* 2001; 159(2): 501-12.
- Ulrich D, Edwards SL, White JF, Supit T, Ramshaw JAM, Lo Cetal. A preclinical evaluation of alternative synthetic biomaterials for fascial defect repair using a rat abdominal hernia model. *PLoS ONE* 2012;7(11):e50044. 1-12.
- Ward PA. Acute and chronic inflammation. In: Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW, eds. *Fundamentals of inflammation*. Cambridge University Press: New York; 2010. p. 1-16.
- Yasojima EY, Teixeira RKC, Houat AP, Costa FLS, Yamaki VN, Feitosa-Júnior DJS, et al. Copaiba oil influences ventral hernia repair with Vycril® mesh? *Arq Bras Cir Dig* 2015;28(3):186-89.
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836-41.