

Isabel Rodrigues Rosado

**EFEITOS IMUNOMODULATÓRIO E NEUROPROTETOR DA APLICAÇÃO
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS
CRIOPRESERVADAS EM RATOS COM TRAUMA EXPERIMENTAL DE
MEDULA ESPINHAL**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo

Coorientadores: Prof. Dr. Alfredo Miranda Goes

Profa. Dra. Rogéria Serakides

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2015

Dedico esse trabalho a minha família

Especialmente

Ao meu marido Endrigo

Aos meus pais Sebastião Carlos da Silva Rosado e Ivonilde Rodrigues Rosado

Aos meus irmãos Lucas e Sara.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora profa. Eliane Gonçalves de Melo por sua dedicação, amizade e pelo conhecimento transmitido.

Ao meu coorientador prof. Alfredo Miranda Goes pela colaboração com a etapa do cultivo celular e pelas sugestões sempre pertinentes.

À minha coorientadora profa. Rogéria Serakides pela orientação nas etapas de cultivo celular, das análises histopatológicas e de PCR.

As professoras Natália de Melo Ocarino e Cleuza Maria de Faria Rezende por terem aceitado participar da pré-defesa e da defesa e por todas as correções sugeridas.

À professora Marília Martins Melo e Milene Alvarenga Rachid por terem participado da qualificação e realizado correções e sugestões que me ajudaram muito na condução do estudo.

Ao professor Mário Sérgio Lima de Lavor e à Carla Maria Osório Silva por participarem da banca de defesa desta tese e por toda colaboração durante a execução deste trabalho.

À professora Roselene Ecco por me ajudar com a aquisição de fotomicroscopias.

À Juliana Lott pela importante colaboração e apoio no laboratório de cultivo celular.

Ao Juneo de Freitas Silva pelo auxílio nas avaliações histopatológicas.

Ao amigo e colega de pós-graduação Pablo Herthel de Carvalho pela participação ativa durante todo o experimento.

A amiga e colega de pós-graduação Tatiana Taguchi pela participação ativa durante todo experimento. Agradeço também a sua amizade e do Felipe Nemer que se tornaram nossa família em Belo Horizonte.

Às alunas de iniciação científica Tayanne, Júlia e Gabriela pelo apoio no experimento.

Aos funcionários do hospital veterinário Ronaldo, Carlos e Tamires.

Aos funcionários do setor de patologia Leimar e Natália.

Aos meus sogros José Walter Leonel Alves e Beatriz Gabellini Alves.

Aos meus pais Sebastião Carlos da Silva Rosado e Ivonilde Rodrigues Rosado pelo amor e educação. Agradeço também a compreensão pelos momentos de ausência.

Aos meus irmãos Lucas Rodrigues Rosado e Sara Rodrigues Rosado pela amizade e pelos bons momentos que vivemos juntos.

Ao meu marido Endrigo Gabellini Leonel Alves pela participação durante todo o experimento e na fase de redação da tese. Agradeço também pelo carinho, companheirismo e compreensão.

À FAPEMIG pelo financiamento do estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 13 |
| ABSTRACT | 14 |
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. HIPÓTESE | 16 |
| 3. OBJETIVOS | 16 |
| 4. REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 4.1. Modelo experimental de trauma de medula espinhal por compressão com balão..... | 17 |
| 4.2. O papel da inflamação no trauma de medula espinhal..... | 18 |
| 4.3. As citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no trauma de medula espinhal..... | 19 |
| 4.4. Os fatores neurotróficos na lesão de medula espinhal..... | 20 |
| 4.5. Uso de células tronco no tratamento do trauma de medula espinhal..... | 21 |
| 4.6. CTM derivadas de tecido adiposo..... | 22 |
| 4.7. Criopreservação de CTM..... | 23 |
| 4.8. Vias de administração de CTM..... | 23 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 5.1. Isolamento, cultivo e expansão de CTM de tecido adiposo..... | 24 |
| 5.2. Caracterização fenotípica das CTM..... | 26 |
| 5.3. Comprovação do potencial de diferenciação das CTM..... | 26 |
| 5.4. Criopreservação e comprovação da viabilidade celular..... | 27 |
| 5.5. Avaliação da conversão do MTT em cristais de formazan..... | 28 |
| 5.6. Procedimento cirúrgico para realização do trauma medular e administração de CTM ou PBS..... | 28 |
| 5.6.1. Animais..... | 28 |
| 5.6.2. Grupos experimentais..... | 29 |
| 5.6.3. Procedimentos anestésico e cirúrgico..... | 29 |
| 5.6.4. Administração de CTM ou PBS..... | 30 |
| 5.7. Avaliação da função motora..... | 30 |
| 5.8. Eutanásia dos animais e coleta das medulas espinhais..... | 32 |
| 5.9. Avaliações histopatológica e imunoistoquímica..... | 32 |
| 5.10. Avaliação da expressão relativa das citocinas anti-inflamatórias, pró-inflamatórias e dos fatores neurotróficos..... | 33 |
| 5.11. Análise estatística..... | 35 |
| 6. RESULTADOS | 36 |
| 6.1. Isolamento, cultivo e expansão de CTM de tecido adiposo..... | 36 |
| 6.2. Caracterização fenotípica das CTM..... | 36 |
| 6.3. Comprovação do potencial de diferenciação das CTM..... | 37 |
| 6.4. Avaliação da viabilidade celular pelo azul de tripan..... | 37 |
| 6.5. Avaliação da conversão do MTT em cristais de formazan..... | 37 |
| 6.6. Pós-operatório e avaliação da função motor..... | 38 |
| 6.7. Avaliação histopatológica..... | 39 |
| 6.8. Avaliação por imunoistoquímica..... | 43 |
| 6.9. Avaliação da expressão relativa de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias..... | 53 |
| 6.8. Avaliação da expressão relativa de fatores neurotróficos..... | 54 |
| 7. DISCUSSÃO | 55 |
| 8. CONCLUSÃO | 61 |

| | |
|---|----|
| 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 62 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |
| 11. ANEXO | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (1996) para avaliação da capacidade motora de ratos e classificação por escores..... | 30 |
| Tabela 2. | Genes com a respectiva sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> iniciadores para RT-PCR em tempo real..... | 35 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Ilustração demonstrando o método de realização de trauma por compressão com balão (Adaptado de Vanický et al., 2001)..... | 17 |
| Figura 2. | Análise imunofenotípica das CTM por meio de citometria de fluxo. A) Gráfico de tamanho versus granulosidade indica a população R1 escolhida para análise dos marcadores CD11, CD34, CD45, CD54, CD73, CD90, MHC-I, MHC-II. Os histogramas apresentam o número de eventos versus intensidade de fluorescência. Os resultados ilustram um evento da cultura de CTM obtidas do tecido adiposo. O gráfico em branco representa a população de células avaliadas para um marcador específico (o deslocamento para direita indica a existência de marcação). B) Porcentagem de células que expressaram os marcadores CD11, CD34, CD45, CD54, CD73, CD90, MHC-I, MHC-II em culturas de CTM indiferenciadas antes do congelamento e após 60 e 90 dias de congelamento..... | 36 |
| Figura 3. | Cultura de CTM extraídas de tecido adiposo de ratos e submetidas à diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica por 21 dias: A) Na diferenciação osteogênica observou-se nódulos de mineralização acobreados corados pela técnica de Von Kossa; B) Na diferenciação condrogênica observou-se proteoglicanos corados em azul pelo Alcian Blue; C) Na diferenciação adipogênica observou-se vesículas lipídicas com aspecto birrefringente e coloração avermelhada no interior das células coradas pela técnica de Oil Red..... | 37 |
| Figura 4. | A) Médias e desvios padrão da porcentagem de células viáveis em culturas de CTM antes do congelamento e após 60 e 90 dias de congelamento ($P < 0,05$). B) Média e desvio padrão da conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM de tecido adiposo de ratos antes do congelamento e após 90 dias de congelamento ($P < 0,05$)..... | 38 |

- Figura 5. Médias e desvios padrão dos escores obtidos nas avaliações da função motora pelo método BBB nos animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP), avaliados às 24, 48, 72 horas e aos oito e 21 dias após trauma. As médias dos escores foram maiores no grupo CTM do que no CP nos tempos de avaliação 72 horas, oito e 21 dias (asteriscos) ($P < 0,05$)..... 39
- Figura 6. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos oito dias após a cirurgia de laminectomia e realização de trauma medular, coloração HE: A e B) Medula espinhal de animal submetido apenas à laminectomia (CN) na qual observa-se a arquitetura do tecido normal (A) e neurônios íntegros com substância de Nissl, núcleos e nucléolos evidentes (setas em B); C) Corte proveniente da região de epicentro de medula espinhal de animal submetido ao trauma apresentando malácia acometendo toda substância branca e cinzenta; D e E) Cortes provenientes das regiões cranial e caudal de medula espinhal de animal submetido a trauma e tratado com CTM; F e G) Cortes provenientes das regiões cranial e caudal de medula espinhal de animal submetido a trauma sem tratamento. Nos cortes histológicos provenientes das regiões craniais e caudais das medulas espinhais de animais submetidos a trauma observaram-se áreas de malácia focalmente extensa acometendo o funículo dorsal e discreta degeneração axonal e tumefação de mielina acometendo os funículos dorsais e laterais. Nesses mesmos animais observaram-se: H) neurônios degenerados, com perda de substância de Nissl e núcleo deslocado para periferia (setas); I) degeneração de substância branca com tumefação de axônios e bainha de mielina (setas) (A, C, D, E, F, G: Barra = 285 μm ; B, H, I: Barra = 35 μm)..... 41
- Figura 7. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos 21 dias após a cirurgia de laminectomia e realização de trauma medular, coloração HE: A e B) Cortes provenientes das regiões cranial e caudal de medula espinhal de animal submetido a trauma e tratado com CTM. C e D) Cortes provenientes das regiões cranial e caudal de medula espinhal de rato submetido a trauma sem tratamento. Nos cortes histológicos provenientes das regiões cranial e caudal dos animais submetidos a trauma observou-se degeneração axonal e de mielina discreta a moderada, difusa, sendo menos intenso no grupo tratado com CTM. (E) Substância branca da medula espinhal de animal submetido a trauma apresentando moderada degeneração de axônios e bainha de mielina (setas). (A,B,C,D: Barra=285 μm ; E: Barra=35 μm)..... 42
- Figura 8. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos submetidos a trauma e tratados com CTM. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. Observar as CTM distribuídas na substância cinzenta (A) e na região de malácia (B); marcadas com anticorpo anti-eGFP (círculos vermelhos) (Barra = 23 μm)..... 43

- Figura 9. A) Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de CD68 na região de funículo dorsal das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP), avaliados oito dias após trauma ($P < 0,05$). Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos oito dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunistoquímica com anticorpo CD68, com Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-coloração por hematoxilina de Harris. B) Medula espinhal de animal submetido apenas a laminectomia, no qual a marcação pelo anticorpo CD68 foi pouco visível. Nas medulas de animais do grupo tratado com CTM (C) e controle positivo (D) a marcação foi mais intensa na região de malacia localizada no funículo dorsal. E) Região de funículo dorsal de medula espinhal de animal tratado com CTM, observar que as células marcadas apresentam volume maior, com citoplasma menos denso. F) Região de funículo dorsal de medula espinhal de animal submetido a trauma sem tratamento, observar que as células marcadas apresentam menor volume e citoplasma mais denso (B,C,D: Barra=285 μm , E,F: Barra=35 μm)..... 44
- Figura 10. Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de CD68 nas substâncias branca (A) e cinzenta (B) das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados oito dias após trauma ($P < 0,05$). Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos oito dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunistoquímica com anticorpo CD68, Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-coloração por hematoxilina de Harris. Cortes provenientes da substância branca (C) e cinzenta (D) de um animal submetido à laminectomia, nos quais houve pouca marcação. Nas medulas espinhais dos animais do grupo tratado com CTM observou-se discreta marcação na substância branca (E) e cinzenta (F). Nas medulas espinhais dos animais submetidos a trauma sem tratamento observou-se marcação intensa na substância branca (G) e cinzenta (H) (Barra=35 μm)..... 46
- Figura 11. Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de CD68 nas no funículo dorsal (A) e nas substâncias branca (B) e cinzenta (C) das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados aos 21 dias após o trauma medular ($P < 0,05$)..... 47
- Figura 12. Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de NeuN nas medulas espinhais de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) nos tempos de avaliação oito (A) e 21 (B) dias ($P < 0,05$). Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos oito e 21 dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunistoquímica com anticorpo, anti-NeuN com Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-coloração por hematoxilina de Harris. Oito dias após trauma observou-se marcação pelo anticorpo anti-

| | | |
|------------|---|----|
| | NeuN mais intensa nas medulas espinhais dos animais do grupo controle negativo (C), seguida pelo grupo controle positivo (D) e o grupo tratado com CTM apresentou a menor marcação (D). No tempo de avaliação 21 dias após trauma a marcação pelo anticorpo NeuN foi maior nos grupos controle negativo (F) e tratado com CTM (G) que no controle positivo (H) (C,D,E,F,G,H:Barra=35 µm)..... | 48 |
| Figura 13. | A) Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de GFAP na região de funículo dorsal das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados aos oito dias após o trauma medular (P<0,05). Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos oito dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunistoquímica com anticorpo, anti-GFAP com Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-coloração por hematoxilina de Harris. Nos cortes histológicos provenientes das medulas espinhais de animais submetidos à laminectomia (B), tratados com CTM (C), e sem tratamento (D) observou-se marcação dos prolongamentos de astrócitos pelo anticorpo GFAP na substância branca e cinzenta. Nas regiões de funículo dorsal observou-se marcação menos intensa no grupo tratado com CTM (F) seguida pelo grupo controle negativo (E) e pelo controle positivo (G) no qual houve a maior marcação (B,C,D:Barra=285 µm; E,F,G: Barra=35 µm)..... | 50 |
| Figura 14. | Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de GFAP nas substâncias branca (A) e cinzenta (B) das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados aos oito dias após o trauma medular (P<0,05)..... | 51 |
| Figura 15. | Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de GFAP no funículo dorsal (A) e nas substâncias branca (B) e cinzenta (C) das medulas espinhais de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados aos 21 dias após o trauma medular (P<0,05). Fotomicroscopias de cortes histológicos provenientes de medulas espinhais de ratos 21 dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunistoquímica com anticorpo, anti-GFAP com Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-coloração por hematoxilina de Harris. Observou-se que a marcação pelo anticorpo anti-GFAP na substância cinzenta foi menos intensa nos grupos controle negativo (D) e tratado com CTM (E) do que no grupo controle positivo (F) (A,B,C:Barra=35 µm)..... | 52 |
| Figura 16. | Médias e desvios padrão das expressões relativas de (A) IL-10, (B) TNF-α e (C) IL-1β nos animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP), avaliados às 24, 48, 72 horas e aos oito e 21 dias após o trauma medular (P<0,05)..... | 53 |

Figura 17. Médias e desvios padrão das expressões relativas de (A) TGF- β , (B) BDNF, (C) GDNF e (D) VEGF nos animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP), avaliados às 24, 48, 72 horas e aos oito e 21 dias após o trauma medular (P<0,05)..... 55

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| CTM | Células tronco mesenquimais |
| EGFP | enhanced fluorescence green fluorescent protein Proteína fluorescente verde |
| BBB | Teste de Basso, Beattie e Bresnahan |
| BHE | Barreira hemato-espinhal |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| IL-1 β | Interleucina-1 beta |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| TGF- β | Fator de transformação do crescimento beta |
| BDNF | Fator neurotrófico derivado do encéfalo |
| GDNF | Fator neurotrófico derivado de células da glia |
| VEGF | Fator de crescimento de endotélio vascular |
| CETEA | Comitê de Ética em Experimentação Animal |
| NeuN | Neuronal nuclear protein |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| CETEA | Comitê de Ética em Experimentação Animal |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |
| LICM | Laboratório de Imunologia Celular e Molecular |
| NCT-TCA | Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal |
| DCCV | Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias |
| EV | Escola de Veterinária |
| INCT | Laboratório de Neurociências e Medicina Molecular |
| PBS | Solução tampão de fosfato padrão |
| DMEM | Dulbecco`s modified Eagle medium ou meio basal |
| PSA | Penicilina, estreptomicina e anfotericina |
| SFB | Soro fetal bovino |
| MTT | brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] |
| SDS | Sódio dodecil sulfato |
| CN | Grupo controle negativo |
| CP | Grupo controle positivo |
| DAB | Diaminobenzidina peroxidase |
| HE | Hematoxilina-eosina |
| RT-PCR | Reação em cadeia de polimerase e transcriptase reversa |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| cDNA | Fita complementar de DNA |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos imunomodulatório e neuroprotetor da aplicação de células tronco mesenquimais (CTM) alógenas e criopreservadas no trauma experimental de medula espinhal em ratos. Foram utilizados dez *Rattus norvegicus* (Lewis, eGFP) para isolamento e criopreservação das CTM. Para estudo do trauma de medula espinhal, foram utilizados 120 *Rattus norvegicus* (Wistar) distribuídos em três grupos experimentais: Controle negativo (CN) - animais submetidos à laminectomia (n=20), Controle positivo (CP) - animais submetidos ao trauma de medula espinhal sem tratamento (n=50) e grupo CTM - animais submetidos ao trauma e tratado com CTM (n=50). As avaliações foram realizadas às 24, 48, 72 horas e aos oito e 21 dias após a cirurgia. Avaliou-se função motora dos animais pelo teste BBB. Foram realizadas análises histopatológicas e imunoistoquímica para quantificação do infiltrado inflamatório (anti-CD68), da integridade neuronal (anti-NeuN) e da ativação de astrócitos (anti-GFAP). Foi realizada quantificação dos transcritos gênicos para IL-10, TNF- α , IL-1 β , TGF- β , BDNF, GDNF e VEGF por RT-PCR em tempo real. Quando comparado ao grupo CP, o grupo CTM apresentou maiores escores nas avaliações de função motora 72 horas, 8 e 21 dias após trauma, bem como menor expressão de CD68 no tempo de avaliação 8 dias e de GFAP aos 21 dias. Adicionalmente, houve menor degeneração da substância branca e maior expressão de NeuN no grupo CTM aos 21 dias. A expressão de IL-10 foi maior no grupo CTM 24 horas após trauma, de GDNF 48 horas e 8 dias e de VEGF 21 dias após trauma. Observou-se, no grupo CTM, menor expressão de TNF- α aos 8 e 21 dias e de TGF- β 24 horas e 21 dias após trauma. Não houveram diferenças na expressão de IL-1 β e BDNF entre os grupos CTM e CP (P<0,05). A administração de CTM reduziu o infiltrado inflamatório, ativou células da micróglia/macrófagos com fenótipo anti-inflamatório, aumentou a quantidade de neurônios íntegros, diminuiu a degeneração da substância branca e a ativação de astrócitos após trauma de medula espinhal. Adicionalmente, as CTM aumentaram expressão de IL-10, de GDNF e de VEGF, e reduziram as de TNF α e TGF- β . Concluiu-se que as CTM criopreservadas promovem efeito imunomodulatório e neuroprotetor em ratos com trauma de medula espinhal, por meio do aumento na expressão de IL-10, GDNF e VEGF, e redução na de TNF α e TGF- β .

Palavras-chave: células tronco mesenquimais, criopreservação, trauma de medula espinhal.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate immunomodulatory and neuroprotective effects of cryopreserved allogenic mesenchymal stem cells (MSCs) application on rat experimental spinal cord injury. Therefore, ten *Rattus norvegicus* were used (Lewis, EGFP) for CTM isolation and cryopreservation. For the spinal cord injury study 120 *Rattus norvegicus* (Wistar) were distributed on three groups: negative control (NC) - animals submitted to laminectomy (n = 20), positive control (CP) - animals submitted to spinal cord injury without treatment (n = 50) and MSC group - animals submitted to spinal cord injury and with MSC treatment (n = 50). The evaluations were made at 24, 48, 72 hours and at eight and 21 days after surgery. Motor function was assessed by BBB locomotor rating scale. Histopathological and immunohistochemical analyzes were performed for measurement of inflammatory infiltration (anti-CD68) of neuronal integrity (anti-NeuN) and astrocyte activation (anti-GFAP). IL-10, TNF- α , IL-1 β , TGF- β , BDNF, GDNF and VEGF gene transcripts measurement were performed by real time RT-PCR. When compared to the CP group, the MSC group showed higher motor function scores at 72 hours, 8 and 21 days after spinal cord injury, lesser CD68 expression at eight days and GFAP at 21 days after spinal cord injury. Furthermore, there was lesser white matter degeneration and higher NeuN expression in MSC group at 21 days. IL-10 expression was higher in the MSC group 24 hours after injury, GDNF 48 hours and 8 days and VEGF 21 days after injury. However it was observed in the MSC group, lower TNF- α expression at 8 and 21 days, and TGF- β 24 hours and 21 days after injury. There were no differences in IL-1 β and BDNF expression between MSC and CP groups ($P < 0.05$). The MSC administration reduced the inflammatory infiltrate, activated microglia cells/macrophages with anti-inflammatory phenotype, increased the amount of intact neurons, decreased degeneration of the white matter and astrocytes activation after spinal cord injury. Additionally, the MSC increased IL-10 expression, GDNF and VEGF, and the reduced TNF and TGF- β . We conclude that MSC cryopreserved promote immunomodulatory and neuroprotective effect in rats with spinal cord injury, by increasing the expression of IL-10, VEGF, and GDNF, and a reduction in TNF and TGF- β .

Keywords: mesenchymal stem cells, cryopreservation, spinal cord injury.

1. INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 2,5 milhões de pessoas no mundo que sofreram trauma de medula espinhal. Frequentemente, esse tipo de lesão provoca déficits neurológicos graves e permanentes, fazendo com que os indivíduos acometidos necessitem de constantes cuidados médicos e de enfermagem. Estima-se que os gastos anuais com tais cuidados podem chegar a três milhões de dólares. Ressalta-se que o trauma de medula espinhal ocorre com maior frequência em jovens saudáveis e em plena fase produtiva. Portanto, essa patologia possui importante impacto social e econômico em toda sociedade (Sekhon e Fehlings, 2001).

Na medicina veterinária de pequenos animais o trauma de medula espinhal também é frequente e as causas mais comuns são atropelamentos e doença de disco intervertebral. O processo de evolução da lesão é semelhante ao que ocorre em seres humanos. Porém, o trauma de medula espinhal na medicina veterinária possui uma perspectiva diferente, pois o comprometimento das funções motora, sensorial e autonômica muitas vezes leva a morte ou a eutanásia dos animais acometidos (Olby, 2010; Spitzbarth et al., 2011).

Os déficits neurológicos provocados pelo trauma de medula espinhal resultam da interrupção direta das vias neuronais e de alterações secundárias progressivas responsáveis por expandir a área de lesão. Dentre os eventos secundários destacam-se a isquemia, excitotoxicidade, peroxidação lipídica, inflamação, necrose e apoptose (Brewer et al., 1999; Hausmann, 2003; Hwan et al., 2006; Dasari et al., 2007).

Existem três fases na resposta ao trauma da medula espinhal: fase aguda, fase subaguda e fase crônica. A fase aguda começa imediatamente após o trauma e estende-se até sétimo dia após a lesão. Nessa fase, a injúria mecânica provoca hemorragia, redução no fluxo sanguíneo, o que posteriormente leva a necrose isquêmica e a falha da função neuronal. Além disso, iniciam-se a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o processo de ativação de células da micróglia e a migração de neutrófilos e monócitos para o foco da lesão. Na fase subaguda, que vai de sete a quatorze dias após o trauma, a reação inflamatória persiste e a produção de radicais livres aumenta consideravelmente. Essas alterações secundárias provocam peroxidação lipídica, induzem apoptose em neurônios e oligodendrócitos, o que culmina com perda de tecido. Na fase crônica que se estende de duas semanas a meses após o trauma ocorre à formação de cicatriz glial e a degeneração dos axônios e suas bainhas de mielina. Portanto, uma característica importante da fisiopatogenia do trauma de medula espinhal é que a lesão final é bem maior do que a existente nas primeiras horas. Dessa forma, a instituição rápida do tratamento é essencial para interromper esses eventos secundários e limitar a perda de tecido (Novikova et al., 1996; Popovich et al., 1997; Hwan et al., 2006).

Entretanto, uma terapia efetiva para esta condição ainda é um dos maiores desafios. Inúmeras pesquisas têm sido realizadas para encontrar alternativas terapêuticas mais eficientes. A terapia com células tronco mesenquimais (CTM) tem sido considerada uma opção promissora (Gu et al., 2010; Osaka et al., 2010; Zhukareva et al., 2010; Nakajima et al., 2012; Zhou et al., 2013; Lin et al. 2014).

O uso de CTM possui algumas vantagens quando comparado aos outros tipos de células tronco. As CTM são células multipotentes que podem ser facilmente isoladas de vários tecidos de indivíduos adultos, dentre eles o tecido adiposo. Além disso, elas podem ser expandidas *in vitro*

em grande quantidade (Nakajima et al., 2012; Dariolli et al., 2013; Dhanasekarqan et al., 2013; Zhou et al., 2013; Alves et al., 2014; Kingham et al., 2014).

Diversas pesquisas têm demonstrado que a administração de CTM na fase aguda ou subaguda promove melhores resultados que a administração na fase crônica (Ankeni et al., 2004; Dasari et al., 2007; Nandoe Tewarie et al., 2009; Osaka et al., 2010; Zhukareva et al., 2010; Nakajima et al., 2012; Hawryluk et al., 2012; Nishimura et al., 2013). Esses resultados apoiam a hipótese de que as CTM podem modular os eventos secundários que se iniciam nessas fases. O mecanismo exato para essa ação ainda não foi esclarecido. Acredita-se que as CTM produzam citocinas e neurotrofinas que modulam a resposta inflamatória e criam um ambiente favorável à sobrevivência e regeneração neuronal (Yune et al., 2003; Nakamura et al., 2003; Mead et al., 2014).

O processo de isolamento, cultivo e expansão de CTM demanda de duas a três semanas, o que inviabiliza a administração precoce dessas células. A solução para esse problema pode ser o estudo e o desenvolvimento de bancos de CTM criopreservadas. Alguns estudos foram realizados para avaliar o processo de criopreservação de CTM, entretanto o principal foco desses estudos foi observar se esse processo altera a viabilidade celular e sua capacidade de manutenção em cultura (Dariolli et al., 2013; Davies et al., 2014).

O presente trabalho pretende avaliar se a aplicação de CTM alógenas criopreservadas, por via intravenosa, três horas após trauma de medula espinhal, possui efeito imunomodulatório e neuroprotetor.

2. HIPÓTESE

As CTM alógenas derivadas de tecido adiposo, criopreservadas, e administradas por via intravenosa de três horas após trauma experimental de medula espinhal possui efeito imunomodulatório e neuroprotetor.

3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos imunomodulatório e neuroprotetor da aplicação de CTM de tecido adiposo alógenas, criopreservadas, por via intravenosa três horas após trauma experimental de medula espinhal em ratos. Para tanto pretende-se:

1. Avaliar a função motora dos animais segundo o teste proposto por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB);
2. Avaliar as alterações morfológicas da medula espinhal por meio de análises histopatológicas;
3. Determinar a presença de CTM no local da lesão por meio de imunoistoquímica com marcação pelo anticorpo anti-EGFP.
4. Quantificar o infiltrado inflamatório por meio de marcação de células da micróglia/ macrófagos ativados pelo anticorpo anti-CD68;
5. Quantificar a sobrevivência neuronal por meio de marcação de neurônios íntegros pelo anticorpo anti-NeuN;
6. Quantificar a ativação de astrócitos por meio de marcação dos prolongamentos astrocitários pelo anticorpo anti-GFAP;
7. Quantificar a expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL-10;
8. Quantificar expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β ;
9. Quantificar expressão gênica dos fatores neurotróficos TGF- β , BDNF, GDNF e VEGF;

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Modelo experimental de trauma de medula espinhal por compressão com balão

Os modelos experimentais são importantes ferramentas para o estudo e desenvolvimento de terapias para o trauma de medula espinhal. O bom modelo experimental deve ser de fácil reprodutibilidade, permitir a quantificação da lesão e correlacioná-la com a recuperação funcional (Vanický et al., 2001)

Os ratos são os animais de laboratório mais utilizados em modelos experimentais, pois o custo para obtenção e manutenção desses animais é baixo, eles são fáceis de manusear, e possuem tamanho suficiente para permitir o monitoramento de parâmetros fisiológicos (Vanický et al., 2001).

No modelo de trauma por compressão com balão utiliza-se um catéter de Fogarty francês número 2, o qual é introduzido no espaço epidural dorsal a medula espinhal através de laminectomia realizada na décima vértebra torácica, e direcionado até o segmento medular correspondente a oitava e nona vértebra torácica. Em seguida o balão é inflado com solução fisiológica para exercer trauma compressivo que é mantido durante cinco minutos (Fig. 1) (Martin et al., 1992; Vanický et al., 2001).

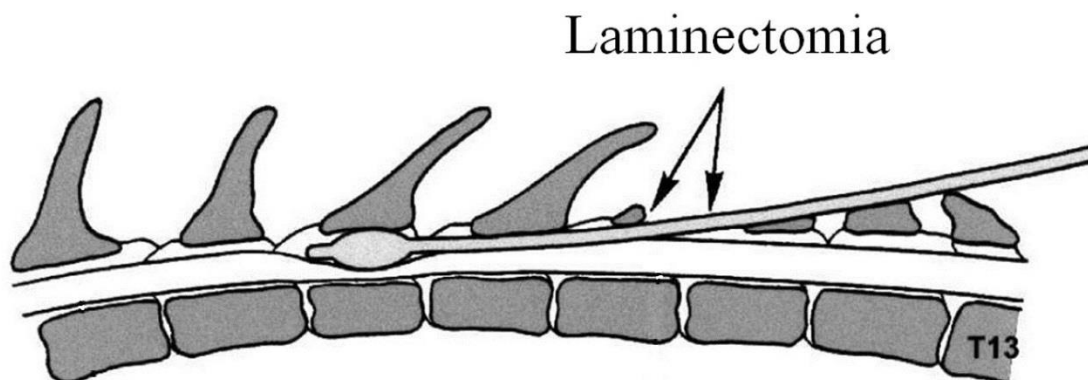


Figura 1. Ilustração demonstrando o método de realização de trauma por compressão com balão (Adaptado de Vanický et al., 2001).

Este modelo experimental possui várias vantagens. Primeiramente ele permite a realização do trauma de medula espinhal com laminectomia fora do epicentro da lesão, isto é, não existe o efeito terapêutico da laminectomia permitindo a expansão da medula edemaciada após o trauma. Dessa forma, esse tipo de modelo reproduz bem um dos mecanismos de trauma mais frequente na medicina veterinária que é o provocado por doenças de disco intervertebral. Além disso, a técnica de compressão por balão é realizada com um cateter disponível mundialmente com tamanho e formato padronizados e comercializados a baixo custo. O procedimento pode ser realizado rapidamente com instrumentos simples, o que permite a fácil reprodução por outros pesquisadores. Portanto, as características supracitadas do modelo justificam o seu uso em estudos de trauma de medula espinhal (Martin et al., 1992; Vanický et al., 2001; Carvalho, 2011).

Outra vantagem desse modelo é que ele permite realizar trauma de intensidades diferentes, de acordo com o volume utilizado para preencher o balão que pode variar de 10 a 100 μ L. O trauma realizado com 30 μ L é de intensidade grave, e induz paraplegia nos animais nas primeiras 24 horas após a injúria. Na análise morfológica, observa-se uma área central de necrose hemorrágica (malácia) que se expande nos sentidos radial e crânio caudal, com formação de uma cavidade cística. Esta cavidade apresenta-se preenchida por células da micróglia ativadas, macrófagos e debris celulares. No epicentro da lesão, essas alterações são mais graves e acometem toda substância branca e cinzenta. Aproximadamente 2,0 mm cranial e caudal ao epicentro elas tornam-se moderadas, enquanto que, a 4,0 mm nos sentidos cranial e caudal ao epicentro a lesão restringe-se principalmente ao funículo dorsal. Ao redor da área de cavitação é possível identificar uma faixa de substância branca preservada, mas onde pode ocorrer degeneração axonal e de mielina. Existe correlação direta entre quantidade de substância branca e cinzenta preservada e recuperação da função motora (Martin et al., 1992; Vanický et al., 2001; Hausmann, 2003).

4.2. O papel da inflamação no trauma de medula espinhal

O trauma de medula espinhal desencadeia uma reação inflamatória intensa que se inicia imediatamente após a ruptura da barreira hematoespinhal (BHE). Nesse momento, as células endoteliais e os astrócitos constituintes dessa barreira liberam citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β). Essas citocinas aumentam a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão celulares, favorecendo migração de leucócitos e monócitos para o foco da lesão (Wang et al., 1996; Lau e Yu, 2001; Hausmann, 2003; Yune et al., 2003; Nishimura et al., 2013). Paralelamente, essas citocinas iniciam o processo de ativação das células da micróglia, alterando a morfologia dessas células, estimulando a sua proliferação e migração para o local da injúria. Esse processo, juntamente com a transformação de monócitos em macrófagos, inicia-se nas primeiras horas e atinge um pico no sétimo dia após o trauma (Wang e Shuaib, 2002; Hausmann, 2003; Nakamura et al., 2003; Spitzbarth et al., 2011; Nishimura et al., 2013; Thompson et al., 2013).

As células da micróglia ativadas e os macrófagos são importantes constituintes da reação inflamatória. Eles realizam algumas ações importantes para o processo de reparação e regeneração teciduais, como remover debris de axônios e mielina que são inibidores da regeneração axonal, e secretar fatores neurotróficos que aumentam a sobrevivência de neurônios e o brotamento axonal (Zhukareva et al., 2010; Spitzbarth et al., 2011). Por outro lado, durante o processo de fagocitose, estas células liberam espécies reativas derivadas de oxigênio, proteases e óxido nítrico. Essas moléculas são citotóxicas, e quando liberadas em grande quantidade provocam apoptose de neurônios e oligodendrócitos. Adicionalmente, as células da micróglia e macrófagos produzem mais TNF- α que perpetua e até mesmo amplifica a reação inflamatória (Wang et al., 1996; Popovich et al., 1997; Bethea et al., 1999; Ledebuer et al., 2000; Bethea e Dietrich, 2002; Wirjatijasa et al., 2002; Nakamura et al., 2003; Thompson et al., 2013).

Recentemente demonstrou-se que existem dois tipos de células da micróglia e macrófagos ativados, um com fenótipo pró-inflamatório e outro anti-inflamatório. O primeiro tipo, denominado macrófago classicamente ativado (M1), apresenta formato amebóide, citoplasma denso, não possui ramificações nem ação fagocitária. O segundo tipo (M2) são macrófagos alternativamente ativados que possuem formato arredondado, citoplasma volumoso e vacuolar. Esses macrófagos possuem alta atividade fagocitária, portanto são mais eficientes em remover debris de mielina e favorecer o brotamento axonal. Além disso, eles produzem enzimas que degradam a cicatriz glial, o que também favorece a regeneração dos tratos motores e sensoriais.

O TNF α favorece a ativação de macrófagos tipo M1, enquanto a interleucina 10 (IL-10) o tipo M2 (Wirjatijasa et al., 2002; Nakajima et al., 2012; Ishii et al., 2013; Thompson et al., 2013).

Outro evento importante que contribui para o processo inflamatório após trauma de medula espinhal é a astrogliose, que consiste na ativação de astrócitos pelas citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 β e pelo fator de crescimento e transformação celular beta (TGF- β). Inicialmente a astrogliose ocorre ao redor da área de necrose com a finalidade de isolar essa região do tecido saudável, de remover moléculas e íons presentes em excesso no foco de lesão, e produzir fatores neurotróficos. Entretanto, os astrócitos ativados produzem mais fatores pró-inflamatórios que agem de forma autócrina recrutando mais astrócitos para formar a cicatriz glial. Aproximadamente quinze dias após trauma, essa cicatriz atinge grande extensão no parênquima medular e funciona como uma barreira mecânica impedindo a regeneração axonal (Popovich et al., 1997; Wang et al., 1997; Lau e Yu, 2001; Bethea e Dietrich, 2002; Nakamura et al., 2013; Nishimura et al., 2013).

O papel exato da reação inflamatória no trauma de medula espinhal não está completamente elucidado. Sabe-se que essa reação é um mecanismo de defesa que pode criar um ambiente favorável para sobrevivência dos neurônios e regeneração dos axônios. Por outro lado, quando ocorre de forma intensa e duradoura a inflamação pode aumentar a perda de tecido e impedir os processos de reparação tecidual (Popovich et al., 1997; Hausmann, 2003).

4.3. As citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no trauma de medula espinhal

As principais citocinas pró-inflamatórias produzidas após o trauma de medula espinhal são o TNF- α e a IL-1 β . O aumento na expressão de TNF- α é promovido principalmente por astrócitos, células da micróglia e macrófagos ativados (Ledeboer et al., 2000; Lau e Yu, 2001; Nakamura et al., 2003; Yune et al., 2003; Hwan et al., 2006; Hawryluk et al., 2012). Por outro lado, grande parte da produção IL-1 β é atribuída aos astrócitos. O aumento na expressão dessas citocinas inicia-se uma hora após trauma e atinge o pico após oito horas, quando começam a diminuir gradativamente até 72 horas. Ocorre um segundo pico na expressão de TNF- α no sétimo dia, que permanece elevada até 14 dias após trauma (Wang et al., 1996; Wang et al., 1997).

Diversas ações pró-inflamatórias são exercidas pelo TNF- α e pela IL-1 β no trauma de medula espinhal tais como: aumento da permeabilidade vascular, da expressão de moléculas de adesão, favorecendo o infiltrado inflamatório; a ativação de células da micróglia, macrófagos e estímulo dessas células para produzirem fatores citotóxicos como espécies reativas derivadas de oxigênio e óxido nítrico; estímulo a proliferação de astrócitos e aumento da extensão da cicatriz glial (Wang et al. 1997; Ledeboer et al., 2000; Lau e Yu, 2001; Bethea e Dietrich, 2002; Wang e Shuaib, 2002; Wirjatijasa et al., 2002; Hausmann, 2003; Nakamura et al., 2003; Yune et al., 2003; Nishimura et al., 2013; Chen et al., 2014). Além disso, o TNF- α potencializa a excitotoxicidade levando a morte neuronal, e aumenta o processo de desmielinização (Hausmann, 2003; Yune et al., 2003; Hwan et al., 2006).

As citocinas anti-inflamatórias são produzidas após trauma de medula espinhal para controlar a resposta inflamatória. Dentre elas, destaca-se a IL-10 que é produzida por células da micróglia, macrófagos e astrócitos após serem expostos a fatores pró-inflamatórios (Ledeboer et al., 2000; Bethea e Dietrich, 2003; Nakamura et al., 2003). A IL-10 reduz a expressão de moléculas de adesão e por consequência o infiltrado inflamatório, ativa células da micróglia e macrófagos com fenótipo anti-inflamatório e diminui a produção de TNF- α (Bethea et al., 1999; Ledeboer et al.,

2000; Wirjatijasa et al., 2002; Jackson et al., 2005; Thompson et al., 2013). Além disso, a IL-10 aumenta a produção de fatores anti-apoptóticos, diminui a liberação de pró-apoptóticos, e impede a liberação de citocromo c e ativação da caspase-3 pelas mitocôndrias. Portanto, essas ações mostram que a IL-10 também possui ação anti-apoptótica em neurônios e oligodendrócitos (Zhou et al., 2009; Wirjatijasa et al., 2002; Hausmann, 2003). Outra ação benéfica atribuída a essa citocina é o aumento da resistência de neurônios à excitotoxicidade (Brewer et al., 1999).

4.4. Os fatores neurotróficos na lesão de medula espinhal

Os fatores neurotróficos são proteínas capazes de regular o processo inflamatório, proteger os neurônios de diferentes tipos de injúria e estimular a regeneração tecidual. Diversos estudos avaliaram a expressão de neurotrofinas após trauma de medula espinhal, bem como a administração delas como terapia (Novikpova et al., 1996; Dolbeare et al., 2003; Na et al., 2010; Hawryluk et al., 2012; Abdanipour et al., 2014; Chou et al., 2014; Figley et al., 2014; Lin et al., 2014).

O TGF- β é conhecido por sua ação na reparação de lesões teciduais. No trauma de medula espinhal o TGF- β estimula a ativação de astrócitos para formar a cicatriz glial. Essa neurotrofina também possui efeito pró-inflamatório aumentando a expressão de moléculas de adesão e a ativação de células da micróglia com citoplasma pequeno, denso e sem ramificações. Essas alterações facilitam a migração de células da micróglia e monócitos para o local da injúria (Wirjatijasa et al., 2002; Kohta et al., 2009).

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) tem sido muito estudado em injúrias do SNC. Estudos observaram que a administração de BDNF após trauma de medula espinhal aumentou a sobrevivência de neurônios motores, reduziu a área de cavitação (necrose) e estimulou o brotamento axonal. A expressão desse fator é muito baixa em indivíduos adultos, portanto para obter esses resultados é necessário administrar a neurotrofina exógena ou utilizar outras formas de terapia que estimulem a sua produção (Novikova et al., 1996; Nakajima et al., 2010; Lin et al., 2014).

O fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF) é uma neurotrofina produzida por astrócitos após serem ativados durante o processo inflamatório. Recentemente, esse fator neurotrófico também tornou-se foco de estudos com trauma de medula espinhal. Demonstrou-se que a administração de GDNF após trauma de medula espinhal reduz a retração de axônios seccionados, diminui a ativação de células da micróglia, aumenta a sobrevivência de neurônios, estimula a regeneração axonal e a recuperação da função motora (Zhang et al., 2013; Dolbeare et al., 2003; Abdanipour et al., 2014; Chen et al., 2014; Lin et al., 2014).

O fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) aumenta a permeabilidade vascular e estimula angiogênese. No trauma de medula espinhal essas ações aumentam o fluxo sanguíneo para o tecido e favorecem o infiltrado inflamatório. Esses eventos, quando em grande intensidade, podem agravar o edema e a destruição tecidual (Shinozaki et al., 2014). Por outro lado, a angiogênese é um processo importante, pois permite maior aporte sanguíneo para o local da lesão, reduz a isquemia e favorece os processos de reparação tecidual (Figley et al., 2014; Li et al., 2014).

O VEGF foi apontado como um fator neuroprotetor e neurotrófico. Descobriu-se que ele aumenta a resistência dos neurônios motores à isquemia prevenindo a apoptose. Alguns estudos

alcançaram resultados positivos em que a administração exógena de VEGF após trauma de medula espinhal reduziu a perda de tecido, estimulou o brotamento axonal e a recuperação funcional (Facchiano et al., 2002; Widenfalk et al., 2003; An et al., 2010; Nakano et al., 2010; Figley et al., 2014; Kingham et al., 2014; Li et al., 2014; Mead et al., 2014; Shinozaki et al., 2014).

4.5. Uso de células tronco no tratamento do trauma de medula espinhal

O uso de CTM no tratamento do trauma de medula espinhal começou a ser estudado por motivos éticos e práticos, pois surgiu a necessidade de encontrar uma nova fonte de células tronco que não fosse derivada de tecido embrionário (Schäffler et al., 2006; Pountos et al., 2007).

As CTM são células tronco multipotentes, isto é, são células capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares como osteoblastos, condroblastos, adipócitos, miócitos e células neurais. Inicialmente, as CTM foram isoladas de medula óssea e posteriormente de outros tecidos de indivíduos adultos como sinóvia, periósteo, polpa dentária e tecido adiposo (Schäffler et al., 2006; Pountos et al., 2007; Lindner et al., 2010; Dariolli et al., 2013; Zhou et al., 2013; Abdanipour et al., 2014; Baer, 2014).

O transplante de CTM é o tratamento do trauma de medula espinhal que promove os melhores resultados. Em alguns estudos observou-se que estas células reduzem o infiltrado inflamatório, a apoptose de neurônios e oligodendrócitos, o volume de lesão, aumentam o brotamento axonal, a quantidade de tecido preservado e favorecem a recuperação funcional (Ankeny et al., 2004; Dasari et al., 2007; Nandoe Tewarie et al., 2009; Gu et al., 2010; Ide et al., 2010; Nakano et al., 2010; Caldeira, 2011; Carvalho, 2011; Nakajima et al., 2012; Kingham et al., 2013; Shin et al., 2013; Zhou et al., 2013; Lin et al., 2014; Mead et al., 2014).

Entretanto, apesar desses resultados, poucas células tronco permanecem vivas duas a três semanas após o transplante e não foi comprovado sua diferenciação em tecido neural funcional. Portanto, o mecanismo exato de neuroproteção não foi completamente esclarecido (Ankeny et al., 2004; Nandoe Tewarie et al., 2009; Gu et al., 2010; Ide et al., 2010; Nakano et al., 2010; Zhukareva et al., 2010; Hawryluk et al., 2012; Zhou et al., 2013; Kingham et al., 2014; Lin et al., 2014).

A administração de células tronco na fase aguda ou subaguda promove melhores resultados que a administração na fase crônica (Ankeny et al., 2004; Dasari et al., 2007; Nandoe Tewarie et al., 2009; Ide et al., 2010; Nakajima et al., 2012; Nishimura et al., 2013; Zhou et al., 2013). Três hipóteses foram levantadas para justificar esse resultado. A primeira sugere que ao serem transplantadas na fase aguda as CTM encontram um ambiente favorável para sua sobrevivência, uma vez que os eventos secundários ainda estão se iniciando (Nandoe Tewarie et al., 2009). Outra hipótese é que as células se distribuem pelo parênquima medular com mais facilidade, pois ainda não existe a barreira mecânica formada pela cicatriz glial (Nishimura et al., 2013). A terceira pressupõe que a administração precoce de células tronco permite que elas modulem os eventos secundários na fase inicial reduzindo o processo de expansão da lesão (Ankeny et al., 2004; Dasari et al., 2007; Ide et al., 2010; Nakajima et al., 2012; Zhou et al., 2013).

A terceira hipótese tem sido o foco de pesquisas recentes, pois se demonstrou em cultura que as células tronco secretam citocinas e neurotrofinas como TNF- α , IL-1 β , IL-10, TGF- β , BDNF, GDNF e VEGF (Zhukareva et al., 2010; Nakajima et al., 2012; Mead et al., 2014). Portanto, acredita-se que após serem transplantadas, as células respondem ao ambiente da medula espinhal, secretam essas citocinas e neurotrofinas e diminuem a intensidade dos eventos secundários como

inflamação, peroxidação lipídica e apoptose. Além disso, as neurotrofinas podem favorecer a sobrevivência dos neurônios e estimular a regeneração axonal (Schäffler et al., 2006; Gu et al., 2010; Nakano et al., 2010; Zhu et al., 2013; Kingham et al., 2014; Lin et al. 2014; Mead et al., 2014).

4.6. CTM derivadas de tecido adiposo

O isolamento de CTM a partir de tecido adiposo é uma opção vantajosa, pois esta é uma fonte abundante no indivíduo adulto e de fácil acessibilidade. Adicionalmente, quando comparado à medula óssea, o tecido adiposo permite o isolamento de maior quantidade de CTM, as quais apresentam taxa de proliferação mais alta e também produzem fatores neurotróficos. Outra característica interessante é que essas células possuem baixa imunogenicidade. Essas características elegem as CTM derivadas de tecido adiposo como uma opção para estudos clínicos e experimentais em medicina regenerativa, principalmente naqueles que utilizam transplantes alogênicos (Schäffler et al., 2006; Dariolli et al., 2013; Dhanasekaran et al., 2013; Zhu et al., 2013; Baer, 2014; Kingham et al., 2014).

O isolamento de CTM de tecido adiposo é realizado pelo método da digestão enzimática, em que a colagenase cliva a ligação de peptídeos do colágeno e libera a fração celular, que é posteriormente separada por lavagem e centrifugação. O próximo passo após o isolamento é a expansão *in vitro* das CTM, etapa que permite a replicação das células até se obter quantidade suficiente para serem utilizadas. Nessa etapa, as CTM são cultivadas em garrafas plásticas contendo meio de cultura, mantidas em estufa umidificada, regulada a temperatura de 37°C, com 5% de CO₂. O tempo de cultivo necessário para obter uma grande quantidade de CTM é de aproximadamente duas a três semanas (Pountos et al., 2007; Dariolli et al., 2013; Dhanasekaran et al., 2013; Abdanipour et al., 2014).

Existem alguns critérios mínimos necessários para se classificar as CTM. Primeiramente elas devem aderir ao plástico quando isoladas e mantidas em cultivo e devem apresentar morfologia semelhante a fibroblastos. Adicionalmente, elas devem possuir capacidade de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* e devem apresentar determinados marcadores de superfície que podem ser reconhecidas por imunofenotipagem (Dominici et al., 2006). Até o momento, não existe um consenso sobre um marcador único e bem definido que caracterize as CTM. Essa divergência se deve ao fato de que essas células possuem inúmeras moléculas de superfície e muitas dessas são encontradas em outros tipos celulares. Dentre as moléculas que devem ser encontradas nas CTM destacam-se CD54, CD73, CD90 e MHC-I. Por outro lado, as CTM não devem apresentar as moléculas de superfície CD11, CD34, CD45, e MHC-II (Schäffler et al., 2006; Pountos et al., 2007; Lindner et al., 2010; Osaka et al., 2010; Dariolli et al., 2013; Dhanasekaran et al., 2013; Kim et al., 2013; Abdanipour et al., 2014; Baer, 2014).

Alguns fatores interferem no potencial de isolamento e expansão das CTM derivadas de tecido adiposo. Dentre eles, a idade do doador, o tipo e localização do tecido adiposo coletado e o procedimento cirúrgico realizado para obtê-lo (Schäffler et al., 2006; Zhukareva et al., 2010). Os fatores relacionados à técnica de cultivo como a quantidade de células plaqueadas, a composição do meio de cultura, a qualidade e o material da garrafa de cultivo, e o número de passagens realizadas também interferem no potencial de expansão das CTM. O meio de cultura é constituído por um meio basal contendo glicose, aminoácidos, cálcio, magnésio, potássio, sódio e fosfato, enriquecido com soro fetal de origem animal em concentração de 10 a 20%. As garrafas de cultura devem ser fabricadas em material plástico que possibilita a aderência e colonização das CTM em

sua superfície. Com o passar do tempo de cultivo, à medida que as células vão sendo expandidas e repassadas para novas garrafas, ocorre um processo de senescência dessas células. Durante esse processo observa-se redução no potencial de replicação e na ação parácrina das CTM. Além disso, algumas dessas células podem sofrer apoptose e até mesmo desenvolver características tumorigênicas (Pountos et al., 2007).

4.7. Criopreservação de CTM

A criopreservação de CTM começou a ser estudada com a finalidade de manter um estoque de células que pode ser prontamente utilizado em grande quantidade, sem a necessidade de esperar o tempo de expansão. Adicionalmente, como as células são congeladas entre a terceira e quinta passagem, evita-se o processo de senescência celular. Outra vantagem é a possibilidade de se criar um banco de CTM alógenas provenientes de indivíduos jovens, ou seja, constituído por células com maior taxa de proliferação e produção de citocinas e neurotrofinas (Dariolli et al., 2013; Zhu et al., 2013; Davies et al., 2014).

Para a adequada criopreservação das CTM alguns fatores devem ser controlados como a temperatura utilizada para o congelamento, a adição de crioprotetores e as velocidades de criopreservação e de descongelamento. A temperatura ideal é aquela que é suficiente para que as reações celulares tornem-se extremamente lentas, ou até parem de ocorrer, mas que após o descongelamento as células devem manter suas características estruturais e de diferenciação. A temperatura de nitrogênio líquido (- 196 °C) é considerada ideal para essa finalidade. Para proteger as CTM do processo de criopreservação são adicionados crioprotetores ao meio de congelamento para prevenir a formação de cristais intra e extracelulares durante o processo de criopreservação. A maioria dos estudos com criopreservação utiliza o protocolo com a adição de 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) ao meio de congelamento. O processo de congelamento deve ser gradual em que as células ficam 24 horas a -80°C antes de serem estocadas a -196°C. O processo de descongelamento deve ser rápido, no qual as CTM devem ser descongeladas a 37°C em banho-maria em menos de cinco minutos. Estudos demonstraram as CTM podem sofrer algumas alterações após a criopreservação, porém as CTM ainda são capazes de se expandir e diferenciar em cultura (Dariolli et al., 2013; Zhu et al., 2013; Davies et al., 2014).

4.8. Vias de administração de CTM

A maioria das pesquisas que avaliou o uso de CTM no trauma de medula espinhal utilizou a via de administração intralésional. Entretanto, a administração de células por essa via possui duas desvantagens, a primeira é a necessidade de se realizar procedimento cirúrgico adicional para expor a medula espinhal e a segunda é a possibilidade de lesionar a medula espinhal no momento da aplicação (Inoue et al., 2003; Shin et al., 2013; Zhang & He, 2014).

O estudo de uma via alternativa menos invasiva faz-se necessário. Dentro desse contexto, outras duas vias têm sido estudadas, a via intratecal e a intravenosa. Todavia, em algumas situações, como nos casos de traumatismos com fraturas de coluna vertebral cervical, não é possível realizar o posicionamento adequado para administração intratecal. Portanto, nesses casos e naqueles em que o paciente não tem condições de ser submetido a procedimento cirúrgico, a via intravenosa é a melhor opção (Inoue et al., 2003; Shin et al., 2013; Zhang & He, 2014).

Alguns trabalhos que avaliaram a administração de CTM por via intravenosa demonstraram que essas células chegam à medula espinhal (Kim et al., 2013; Shin et al., 2013). Acredita-se que após

a administração intravenosa as CTM são recrutadas para a medula espinhal devido à ruptura da barreira hemato-espinhal e a mecanismos de atração celular como fatores quimiotáticos e moléculas de adesão vasculares e intercelulares (Inoue et al., 2003). Portanto, a administração precoce das CTM favorece a chegada dessas células no parênquima medular e proporciona os melhores resultados (Osaka et al., 2010). O padrão de distribuição das CTM na área de lesão apresenta diferença entre as vias de administração. Na via intralésional as células tendem a ficar agrupadas no local da aplicação, enquanto na via intravenosa elas se distribuem ao redor da área de cavitação (Kim et al., 2013).

Os resultados obtidos com a aplicação de CTM por via intravenosa são semelhantes aos observados após a administração intralésional. As CTM reduzem a área de lesão, estimulam a remielinização e a recuperação funcional (Inoue et al. 2003; Osaka et al.; 2010; Kim et al., 2013; Shin et al., 2013).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas internacionais de bem estar animal após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), com protocolo de nº 41/2012 (Anexo 1).

Para execução do trabalho foram utilizadas as seguintes instalações da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG):

- Biotério do Departamento de Bioquímica do ICB/UFMG;
- Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) do ICB/UFMG;
- Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal (NCT-TCA) do DCCV da EV/UFMG;
- Biotério Experimental do Centro de Experimentação de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da EV/UFMG;
- Sala de Cirurgia Experimental de Pequenos Animais do DCCV da EV/UFMG;
- Laboratório de Patologia Molecular do Setor de Patologia do DCCV da EV/UFMG;
- Laboratório de Patologia e Imunoistoquímica do Setor de Patologia do DCCV da EV/UFMG;
- Laboratório de Neurociências e Medicina Molecular – INCT da Faculdade de Medicina/UFMG

5.1. Isolamento, cultivo e expansão de CTM de tecido adiposo

Para coleta de tecido adiposo e obtenção de CTM foram utilizados dez *Rattus norvegicus*, linhagem Lewis, machos, com quatro semanas de vida, transgênicos homozigóticos para proteína verde fluorescente – GFP (LEW-Tg e GFP F455/Rrrc), provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICB/UFMG.

Os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose de tiopental sódico¹ (100,0 mg/kg) e, posteriormente, foram realizadas tricotomia e antisepsia do abdômen para coleta do tecido adiposo retroperitoneal em capela de fluxo laminar. A cavidade abdominal foi exposta por celiotomia mediana retro umbilical e o tecido adiposo retroperitoneal próximo à pelve foi cuidadosamente removido sem inclusão de vasos visíveis e vísceras adjacentes. Realizou-se um

¹ Thiopentax ®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Brasil

pool do tecido adiposo coletado dos animais. O tecido foi lavado por imersão em solução tampão de fosfato padrão 0,15M (PBS) pH 7,2, e transferidos para tubos Falcon de 50 mL estéril² contendo meio de cultura para células tronco Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) com baixa glicose³ enriquecido com penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100µg/mL e anfotericina 25µg/mL (PSA) e gentamicina⁴ 60 µg/L. As amostras foram levadas à sala de cultivo celular do LICM do ICB/UFMG para processamento.

Sob condições de assepsia, os frascos contendo o tecido adiposo foram transferidos para capela de segurança biológica grau II. Dentro da capela, o meio de cultura foi descartado e o tecido adiposo lavado com PBS 0,15M. Após esse procedimento, foram adicionados em cada tubo, 10,0 mL de solução de colagenase⁵ 0,15% p/v diluída em PBS 0,15M e o tecido adiposo foi fragmentado a pedaços menores com tesoura estéril posicionada dentro do tubo. Os frascos foram incubados por 60 min a 37° C e agitados a cada 15 min. Em seguida, foram adicionados em cada frasco, 20,0 mL de DMEM enriquecido com PSA, gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB)⁶ para inativação da enzima. O conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e 23°C. Descartou-se o sobrenadante, e o *pellet* contendo as células foi ressuspensão em 5,0 mL de DMEM com PSA, gentamicina e 10% de SFB, e plaqueado em garrafas T75⁷.

As garrafas foram mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37° C durante 24 horas. No dia seguinte, o meio de cultura das garrafas foi removido por pipetagem e transferido para um tubo Falcon de 50,0 mL. O tubo foi centrifugado por 10 minutos, a 1500 rpm, e 23°C, e o *pellet* formado foi ressuspensão e plaqueado em novas garrafas T75. As garrafas que tiveram o meio removido receberam 5,0 mL de DMEM com PSA, gentamicina e 10% de SFB, e foram devolvidas para estufa.

As garrafas foram avaliadas a cada 72 horas em microscópio ótico invertido e tiveram seu meio de cultura trocado. Ao atingir 80 ou 90% de confluência, as células foram removidas da garrafa de cultivo e replaqueadas em novas garrafas para permitir a expansão celular, etapa esta denominada de passagem celular. Para realizar a passagem celular, as garrafas tiveram o meio de cultura removido e foram lavadas duas vezes com 5,0 mL de PBS 0,15M. Posteriormente, adicionou-se 750 µL de solução de tripsina⁸ em cada garrafa, e as mesmas foram mantidas na estufa por 5 minutos para ação enzimática. Em seguida, as garrafas foram rapidamente avaliadas no microscópio para confirmar o desprendimento das células, e foi adicionado 1,0 mL de DMEM com PSA, gentamicina e 10% de SFB para inativação da tripsina.

O conteúdo das garrafas foi transferido para tubos Falcon de 50,0 mL e centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm e 23°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 1,0 mL de DMEM com PSA, gentamicina e 10% de SFB. Uma alíquota de 2,0 µL da solução contendo as células foi adicionada a 98,0 µL de solução de Turkey homogeneizada e transferida para câmara de Neubauer para contagem da concentração celular. Foram replaqueadas, em cada passagem, 2,0 x 10⁴ células por garrafa T75. As garrafas foram mantidas na estufa sob as mesmas condições anteriores, monitoradas diariamente e submetidas às trocas de meio a cada 72 horas.

² Centrifuge Tubes 50 ml, Techno Plastic Products, Switzerland.

³ DMEM, Gibco, USA.

⁴ Gentamicina, Ariston Indústrias e Farmacêuticas Ltda, Brasil.

⁵ Colagenase B, Roche Applied Science, Germany.

⁶ Soro fetal bovino estéril, LGC Biotecnologia Ltda, Brasil.

⁷ Tissue Culture Flasks 75, Techno Plastic Products, Switzerland.

⁸ Trypsin 0,05% EDTA, Gibco, USA.

O processo de expansão celular foi realizado até a quarta passagem, momento no qual ao invés de serem replaqueadas, as células foram congeladas para confecção de um banco de células. Quatro garrafas foram mantidas em cultura para as etapas de caracterização das células tronco mesenquimais, seguindo as normas da Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy – ISCT) publicadas por Dominici et al. (2006).

5.2. Caracterização fenotípica das CTM do tecido adiposo

Para caracterização fenotípica por citometria de fluxo, uma amostra de CTM de cada procedimento de extração foi submetida à imunofenotipagem antes do congelamento e após o descongelamento, utilizando-se os anticorpos monoclonais primários de camundongo⁹, anti-CD45 (clone 69), anti-CD90 (clone Ox-7), anti-CD73 (clone 5 F/B9), anti-CD54 (clone 1A29), anti-CD11, anti-MHC I e anti-MHC II. Para cada anticorpo foram utilizadas $1,0 \times 10^6$ células, sendo o procedimento realizado em triplicata.

Após o desprendimento das células pela ação da tripsina, as células foram contadas em câmara de Neubauer e divididas em 27 *ependorffs* identificados com os anticorpos testados, o controle da reação (branco) e o controle do anticorpo secundário. As células foram lavadas duas vezes com 1,0 mL de PBS e centrifugadas durante 7 min, à 1400rpm e 23°C. Posteriormente, cada amostra foi incubada por 30min a 4°C com solução de PBS contendo o anticorpo primário. Seguiu-se a centrifugação dos *ependorffs*, descarte do sobrenadante, duas lavagens com solução de PBS e a incubação com o anticorpo secundário Alexa 555¹⁰, sob as mesmas condições descritas anteriormente. As células foram novamente lavadas duas vezes com 1,0 mL de PBS e centrifugadas durante 7 min, à 1400rpm e 23°C. Posteriormente, adicionou-se 100,0 µL de PBS e 100,0 µL de paraformaldeído 4 %, e imediatamente encaminhadas para leitura no citômetro de fluxo FACScan¹¹ utilizando o software CellQuest®¹², com um mínimo de 30.000 eventos por amostra testada. Cada leitura foi realizada em triplicata. O controle da reação (branco) recebeu apenas PBS em cada um dos momentos de incubação com anticorpo e o controle do anticorpo secundário recebeu PBS no primeiro momento e, em seguida, o anticorpo secundário

5.3. Comprovação do potencial de diferenciação das CTM do tecido adiposo

Para comprovação dos potenciais de diferenciação osteogênico, condrogênico e adipogênico uma amostra de CTM de cada procedimento de extração foi submetida a cada um dos protocolos de diferenciação antes e após o descongelamento, assim como sugerido por Pittenger et al. (1999), Deans e Moseley (2000) e Dominici et al. (2006). Os controles de cada tipo de diferenciação foram cultivados em meio basal que é constituído de DMEM com PSA, gentamicina e 10% de SFB.

Para diferenciação osteogênica, as CTM foram plaqueadas na densidade de $1,0 \times 10^4$ células/cm², em seis repetições, em placas de seis e 24 poços. Após 24 horas de cultivo em meio basal, os meios de três poços foram substituídos por meio osteogênico que foi constituído de DMEM enriquecido com ácido ascórbico (50,0 µg/mL), β-glicerofosfato (10,0 mM)¹³ e dexametasona

⁹ BD Biosciences, EUA.

¹⁰Alexa 555, InVitrogen, Life Technologies, EUA.

¹¹ FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry, EUA.

¹² The Cell Quest™ Software, Becton Dickinson Immunocytometry, EUA.

¹³ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

(0,1 μM)¹⁴, acrescido de 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂ por 21 dias com o meio trocado a cada 72 horas. Transcorrido esse período, os poços foram lavados com PBS e fixados em álcool 70° por 24 horas e, posteriormente corados pela técnica de Von Kossa para visualização dos nódulos de mineralização e confirmação da diferenciação osteogênica.

Para diferenciação condrogênica 1,0 x 10⁵ CTM células foram colocadas em tubos Falcon de 15,0 ml totalizando seis tubos e cultivadas em meio basal por 24 horas. Após esse período os meios de três tubos foram substituídos por meio condrogênico que foi constituído do DMEM enriquecido com soro fetal bovino (1%), albumina sérica bovina (0,0125 g/mL), piruvato (100,0 μM), insulina (6,25 $\mu\text{g/mL}$), transferrina (6,25 $\mu\text{g/mL}$), ácido ascórbico (50,0 μM), dexametasona (100,0 nM) e TGF- β 1¹⁵ (10,0 ng/mL). Em seguida as células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂ por 21 dias e o meio de cultura trocado a cada quatro dias. Transcorrido esse período, os *pellets* celulares foram fixados em paraformaldeído 4%, tamponado por 60 minutos e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Cortes histológicos com 5,0 μm de espessura foram corados pela técnica de Alcian Blue e avaliados por microscopia óptica, para visualização dos proteoglicanos e confirmação da diferenciação condrogênica.

Para diferenciação adipogênica as CTM foram plaqueadas na densidade de 1,0 x 10⁴ células/cm², em seis repetições em placas de seis poços. Após 24 horas de cultivo em meio basal, os meios de três poços foram substituídos por meio adipogênico substituindo-se o meio basal por meio adipogênico que é constituído do DMEM enriquecido com soro fetal bovino (10%), dexametasona (1,0 μM), insulina (10,0 $\mu\text{L/mL}$), indometacina (100,0 mM) e isobutimetilxantina (500,0 mM). Em seguida, as células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂ por 21 dias e o meio de cultura trocado a cada quatro dias. Transcorrido esse período, as células foram fixadas em formalina 10% por 60 minutos, coradas pela técnica de Oil Red avaliados por microscopia óptica, para visualização de vesículas lipídicas e confirmação da diferenciação adipogênica.

Todas as etapas de caracterização das CTM foram realizadas antes do congelamento e após o descongelamento para utilização das células, posteriormente.

5.4. Criopreservação e comprovação da viabilidade celular

As CTM da quarta passagem foram desprendidas das garrafas, centrifugadas, ressuspensas em PBS, e contadas em câmara de Neubauer para se realizar o congelamento. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensas na concentração de 1,0 x 10⁶ células/mL/tubo no meio de congelamento que foi constituído de 50% de DMEM, 40% de SFB, e 10% de DMSO. Foram preparadas 75 doses (tubos), colocadas em container para criopreservação e acondicionados em freezer -70/80°C, envoltos em isopor, para que a troca de temperatura ocorresse lentamente. Após 24 horas, os tubos foram colocados em raques e estocados a -196°C em nitrogênio líquido, por um período de dois a três meses, até as CTM foram utilizadas para o transplante.

As doses foram descongeladas 48 horas antes do transplante. Para descongelamento, os criotubos foram mergulhados em banho maria a 37°C por cerca de 30 segundos e centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as CTM foram lavadas duas vezes com PBS 0,15M. Em seguida, as CTM foram replaqueadas em garrafas T75cm, cultivadas em DMEM com

¹⁴ Aché, Guarulhos, SP, Brasil

¹⁵ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

PSA, gentamicina e 10% de SFB, e mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37° C, até o transplante. Cerca de duas horas antes do transplante, as CTM foram desprendidas das garrafas de cultivo por meio da ação da tripsina. Em seguida, foram lavadas e ressuspensas em PBS 0,15M. Após homogeneização, uma alíquota de 2,0 µL da suspensão contendo as células foi corada pelo azul de tripan e as células viáveis (transparentes) e inviáveis (azuis) foram quantificadas em câmara de Neubauer. A concentração de células viáveis foi utilizada para determinar o volume da suspensão necessário para se obter a concentração 1,0 x 10⁶ células/0,5mL, desejada para o transplante celular.

5.5. Avaliação da conversão do MTT em cristais de formazan

Para o teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} em formazan, três doses de CTM foram descongeladas em banho maria a 37°C por cerca de 30 segundos e centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado, as CTM foram lavadas duas vezes com PBS 0,15M, replaqueadas na densidade de 1,0 x 10⁵ células/cm² em placas de 24 poços e cultivadas em DMEM com PSA, gentamicina e 10% SFB por 48 horas. Posteriormente, o meio foi trocado por 210,0 µL de DMEM com PSA e 10% SFB em cada poço e 170,0 µL de MTT (5mg/mL)¹⁶. A placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210,0 µL de SDS (sódio dodecil sulfato)-10% HCl, que permaneceu *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, 100,0 µL de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. Esse mesmo procedimento foi realizado em triplicata antes do congelamento e após o descongelamento.

5.6. Procedimento cirúrgico para realização do trauma medular e administração de CTM ou PBS

5.6.1. Animais

Foram utilizados 120 *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar, machos, com peso de 300 a 350g. Durante o período de quarentena os animais foram desverminados e receberam medicação de uso tópico contra ectoparasitas¹⁷. Durante todo o período experimental, eles foram mantidos no Biotério Experimental do Centro de Experimentação de Pequenos Animais do DCCV da EV/UFMG, alojados em caixas com quatro animais cada, sob condições de umidade e temperatura controladas, fotoperíodo de 12 horas, e receberam ração comercial para roedores¹⁸ e água *ad libitum*.

¹⁶ Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

¹⁷ Frotline, Merial, Brasil.

¹⁸ Nuvilab CR-1®, Nuvital Nutrientes S/A, Brasil.

5.6.2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, sendo que cada grupo foi subdividido em cinco tempos de avaliação: 24h, 48h, 72h, 8 dias e 21 dias.

- Controle negativo (CN): Composto por 20 animais, distribuídos igualmente nos tempos de avaliação: 24h, 48h, 72h, 8 dias e 21 dias. Os animais foram submetidos à laminectomia e três horas após foi realizada aplicação intravenosa de PBS.
- Controle positivo (CP): Compostos por 50 animais, distribuídos igualmente nos seguintes tempos de avaliação: 24h, 48h, 72h, 8 dias e 21 dias. Esses animais foram submetidos a trauma de medula espinhal e três horas após foi realizada aplicação intravenosa de PBS.
- Tratado com células tronco mesenquimais (CTM): Compostos por 50 animais, distribuídos igualmente nos seguintes tempos de avaliação: 24h, 48h, 72h, 8 dias e 21 dias. Esses animais foram submetidos a trauma de medula espinhal e três horas após foi realizada aplicação intravenosa de $1,0 \times 10^6$ CTM por animal.

5.6.3. Procedimentos anestésico e cirúrgico

Os animais receberam indução e manutenção anestésicas com isoflurano¹⁹, fornecido por meio de máscara facial em sistema semiaberto. Com os animais anestesiados, foi realizada a tricotomia da região dorsal, antibioticoterapia profilática com cefalotina sódica²⁰ (60,0 mg/kg/SC) e analgesia com morfina²¹ (5,0 mg/kg/SC).

Após tricotomia ampla do dorso do animal e antisepsia com polivinilpirrolidona degermante²² e álcool iodado²³, foi realizada uma incisão de pele na linha média dorsal de 2,0 cm, estendendo-se do processo espinhoso da oitava vértebra torácica (T8) a primeira vértebra lombar (L1). O tecido subcutâneo foi divulsionado, as inserções dos músculos epaxiais foram incisadas e os músculos afastados lateralmente. Com o auxílio de uma goiva Luer-Friedmann²⁴ realizou-se a osteotomia do processo espinhoso da décima vértebra torácica (T10), seguindo-se o desgaste da lâmina dorsal com broca acoplada ao drill pneumático neurológico²⁵. Após o desgaste, a lâmina dorsal foi removida com uma pinça Halstead. A medula espinhal foi exposta e a dura mater mantida íntegra. Para promover a lesão medular compressiva aguda foi utilizado um catéter de Fogarty²⁶ francês n.2. O cateter foi introduzido no espaço epidural e conduzido cranialmente até o segmento T8-T9, o balão do catéter foi preenchido com 30µl de solução fisiológica a 0,9% e mantida pressão, sobre a medula, durante cinco minutos, conforme técnica descrita por Vanicky et al. (2001). Em seguida, o balão foi esvaziado e o catéter removido. Realizou-se a aproximação da musculatura e do tecido subcutâneo empregando sutura padrão simples contínuo com fio de poliamida 3-0²⁷ e a dermorrafia com o mesmo fio em padrão simples interrompido.

Após a cirurgia, os animais permaneceram em caixa aquecida até completa recuperação anestésica, e receberam solução NaCl a 0,9% na taxa de manutenção (15,0 mL/kg), via

¹⁹ Isoflurane, Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda, Brasil.

²⁰ Cefalotina, Ariston Indústrias e Farmacêuticas Ltda, Brasil.

²¹ Morfina 10mg/ml, Produto genérico, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil.

²² Riodene, PVPI-I, Rioquímica Indústria Farmacêutica, Brasil.

²³ Riodene, Álcool Iodado, Rioquímica Indústria Farmacêutica, Brasil.

²⁴ Luer-Friedmann DX500R, Aesculap, Germany.

²⁵ ECCOS® Aesculap, Laboratório B. Braun, Brasil.

²⁶ Fogarty Catheter, Edwards Lifesciences LLC, EUA.

²⁷ Nylons®, Ethicon Endo Surgery, Brasil.

subcutânea. A analgesia pós-operatória foi realizada com morfina (5,0 mg/kg/SC) a cada 8 horas nas primeiras 24 horas. No segundo e terceiro dia após o trauma, os animais receberam tramadol²⁸ (2,0 mg/kg/SC), a cada 12 horas. Realizou-se massagem abdominal para esvaziamento vesical a cada 8 horas, durante todo período de avaliação. Os animais foram monitorados quanto à presença de secreção ou sinais de infecção da ferida cirúrgica, de infecção urinária e uremia.

5.6.4. Administração de CTM ou PBS

Três horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram cuidadosamente contidos para aplicação intravenosa das CTM ou PBS. A veia lateral da cauda foi puncionada com um cateter 24G²⁹ e foi administrado 0,5 mL de PBS 0,15M nos grupos controle (CN e CP) e 1,0 x 10⁶ células suspensas em 0,5 mL de PBS 0,15M no grupo CTM.

5.7. Avaliação da função motora

A avaliação da capacidade motora foi realizada antes da intervenção cirúrgica, 24 horas após a cirurgia e a cada sete dias até completar um período de 21 dias. O método utilizado para avaliação motora foi o proposto por BBB descrito por Basso et al. (1996). Para tanto, os animais foram filmados durante dois minutos, em um campo aberto circular de 1,0 m de diâmetro. Posteriormente, os vídeos foram analisados por dois avaliadores previamente treinados, que desconheciam os grupos a que os animais pertenciam (estudo cego). Esses avaliadores observaram o padrão locomotor dos animais, atribuindo um escore de zero a 21 (Tab. 1).

Tabela 1. Escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (1996) para avaliação da capacidade motora de ratos e classificação por escores.

| ESCORE | DEFINIÇÃO |
|--------|---|
| 0 | Nenhum movimento observável dos membros. |
| 1 | Movimento discreto de uma ou duas articulações, geralmente coxo-femoral e/ou do joelho. |
| 2 | Movimento extenso de uma articulação OU Movimento extenso de uma articulação e discreto de outra. |
| 3 | Movimento extenso de duas articulações. |
| 4 | Movimento discreto das três articulações. |
| 5 | Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira. |
| 6 | Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira |
| 7 | Movimento extenso das três articulações. |

²⁸ Tramadol, Laboratórios Pfizer, Brasil.

²⁹ BD Insyte™ Autoguard™, BD, SP, Brasil.

| | |
|----|--|
| 8 | Pedalada sem suporte de peso OU Apoio plantar sem suporte de peso. |
| 9 | Apoio plantar com suporte de peso na fase de apoio OU Passada dorsal com suporte de peso ocasional, freqüente ou consistente ou Ausência de passada plantar. |
| 10 | Passo plantar com suporte de peso ocasional e ausência de coordenação entre membros torácicos e pélvicos. |
| 11 | Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e ausência de coordenação. |
| 12 | Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação ocasional. |
| 13 | Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação freqüente. |
| 14 | Passo plantar com suporte de peso e coordenação consistentes. Com rotação externa ou interna da pata no contato inicial com piso e antes de liberar os dedos (final da fase de apoio). OU passo plantar freqüente, coordenação consistente e passos dorsais ocasionais. |
| 15 | Passo plantar e coordenação consistentes e dedos encostam constantemente ou freqüentemente no piso durante a elevação do membro. A pata está predominantemente paralela ao corpo no contato inicial. |
| 16 | Passo plantar e coordenação consistentes e os dedos encostam ocasionalmente durante o avanço do passo. A pata está predominantemente paralela no contato inicial e rotacionada quando se eleva durante o avançar do passo. |
| 17 | Passo plantar e coordenação consistentes, dedos encostam ocasionalmente no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. |
| 18 | Passo plantar e coordenação consistentes, os dedos praticamente não encostam mais na superfície. A pata está paralela no contato inicial e rotacionada no momento de elevação da pata. |
| 19 | Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está baixa parte ou todo tempo. |
| 20 | Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima, porém há instabilidade do tronco. |
| 21 | Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima e há estabilidade do tronco. |

5.8. Eutanásia dos animais e coleta das medulas espinhais

Transcorridos os tempos de avaliação, os animais receberam sobredose de tiopental sódico³⁰ (100,0 mg/kg), por via intraperitoneal, e após atingirem plano anestésico profundo a maior parte do sangue circulante foi coletado por punção cardíaca. Todas as amostras foram coletadas imediatamente após a parada cardiorespiratória. Cinco animais dos grupos experimentais CP e CTM foram destinados às avaliações histopatológica e imunoistoquímica e os outros cinco animais foram utilizados para avaliação da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e dos fatores neurotróficos, em cada tempo de avaliação. No grupo CN, quatro animais foram destinados para cada avaliação por tempo de avaliação.

5.9. Avaliações histopatológica e imunoistoquímica

Realizou-se avaliações histopatológica e imunoistoquímica apenas nos animais nos tempos de avaliação de 8 e 21 dias. Para tanto, as colunas vertebrais contendo as medulas espinhais foram coletadas e fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% por 24 horas. Posteriormente, elas foram transferidas para frascos com álcool 70% e armazenadas até realização da técnica de inclusão em parafina.

As colunas vertebrais foram dissecadas para retirar um segmento de 2,4 cm de medula espinhal, centralizado no epicentro da lesão. Em seguida, os segmentos foram processados e antes de serem inseridos no bloco de parafina, cada segmento foi dividido em três partes iguais de 0,8 cm e identificado como cranial, epicentro e caudal.

Os segmentos de medula foram submetidos a cortes seriados para caracterização da lesão. Iniciou-se com a retirada de quatro cortes de quatro micrômetros cada, que foram distribuídos em duas lâminas gelatinizadas, dois cortes por lâmina. Em seguida, 500µm foram desbastados e mais quatro cortes foram obtidos e colocadas em duas lâminas, assim sucessivamente, até o final da área de lesão. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e observadas à microscopia óptica.

Para descrição histopatológica foram selecionadas duas lâminas por animal contendo área de necrose focalmente extensa no funículo dorsal, uma proveniente da região cranial e a outra da região caudal ao epicentro da lesão. Para realização das reações de imunoistoquímica padronizou-se a utilização das primeiras lâminas do segmento caudal contendo área de necrose focalmente extensa no funículo dorsal. Nos animais do grupo CN negativo tanto para análise histopatológica descritiva quanto para imunoistoquímica utilizou-se lâminas provenientes da região correspondente ao epicentro. Foi avaliado uma lâmina por animal para cada anticorpo.

Foram utilizados os anticorpos primários: anti-EGFP (1:1500)³¹ para identificar as CTM transplantadas; anti-CD68 (1:200)³² para avaliação de células da microglia ativadas e macrófagos; anti-NeuN (1:500)³³ para avaliação de corpos neuronais e anti-GFAP (1:200)³⁴ para avaliação de prolongamentos de astrócitos.

³⁰ Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Brasil

³¹ Anti-EGFP, Coelho/polyclonal, Abcam, EUA.

³² Anti-CD68 (ED1), Camundongo/monoclonal Abcam, EUA.

³³ Anti-NeuN, Camundongo/monoclonal, Chemicon Temecula, EUA.

³⁴ Anti-GFAP, Coelho/polyclonal, Abcam, EUA.

As lâminas foram colocadas em xilol para serem desparafinadas e em seguida hidratadas em concentrações decrescentes de álcool. Foi realizada recuperação antigênica por meio de aquecimento das lâminas por 40 minutos em solução de ácido cítrico a 0,05% (20 minutos em banho maria e 20 minutos em repouso na mesma solução); em seguida, o bloqueio das peroxidases endógenas em solução de metanol e peróxido de hidrogênio (0,3% H₂O₂), por 30 minutos, em câmara escura. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados por 30 minutos com solução bloqueio³⁵ também em câmara úmida e escura para bloqueio de epítomos inespecíficos. Na sequência, as secções histológicas foram incubadas *overnight*, na câmara úmida e escura, a 4°C, com os anticorpos primários. Cortes controles, com omissão do anticorpo primário, foram realizados em todas as reações para verificar a especificidade da marcação. No dia seguinte, após lavagem com PBS o anticorpo secundário³⁶ foi adicionado, e os cortes incubados por 45 minutos. Acrescentou-se o complexo estreptoavidina biotina peroxidase³⁷ e foi novamente incubado por mais 30 minutos. As reações foram reveladas com 3-3' diaminobenzina peroxidase (DAB)³⁸ lavadas em água corrente por 10 minutos, e contra coradas com hematoxilina de Harris. Após estas etapas, procederam-se a desidratação padrão, e montagem das lâminas com lamínulas e bálsamo do Canadá.

As lâminas marcadas por esses anticorpos foram fotografadas e analisadas pelo software de análise de imagem ImageJ³⁹, sendo que, para cada imagem foi quantificada a média da densidade integrada de pixels das células subtraída do *background*.

5.10. Avaliação da expressão relativa das citocinas anti-inflamatórias, pró-inflamatórias e dos fatores neurotróficos.

Nos animais destinados à avaliação de expressão gênica, um segmento de 1,5cm da medula espinhal centralizado no epicentro foi retirado. As amostras de medula foram colocadas em criotubo RNAase e DNAase *free* com 1,0 ml de trizol⁴⁰ e maceradas com auxílio de uma pinça hemostática estéril. Os criotubos foram então congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados em freezer⁴¹ a -80 °C.

Foram avaliadas as expressões relativas dos transcriptos gênicos para a citocina anti-inflamatórias IL-10; as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β ; e fatores neurotróficos TGF- β , BDNF, GDNF e VEGF, por meio de RT-PCR em tempo real.

Foi realizada a extração do RNA total de cada amostra pela técnica do Trizol. As amostras foram descongeladas, transferidas para um tubo cônico e maceradas com auxílio de pistilo plástico estéril livre de RNA e DNA. Após a maceração, as amostras foram incubadas por 5 minutos, seguindo-se a adição de 200,0 μ L de clorofórmio e agitação vigorosamente por 15 segundos. Os tubos foram incubados por mais 5 minutos sob refrigeração e centrifugados a 11400 rpm por 15 minutos, a 4 °C, para separação das três fases. A fase aquosa (transparente) foi transferida para novos tubos, e foram adicionados 500,0 μ L de álcool isopropílico para precipitação do RNA. As amostras foram congeladas a -80°C por 30 minutos. Após esse período as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 11400 rpm por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado

³⁵ Protein Block(Serum Free), DAKO, EUA.

³⁶ LSABTM, Link for AP/HRP, DAKO, EUA.

³⁷ LSABTM, Streptavidin/HRP, DAKO, EUA.

³⁸ DAB, DAKO, EUA.

³⁹ National Institutes of Health, USA.

⁴⁰ Trizol, Invitrogen, Life Technologies, USA.

⁴¹ Revco DxF, Thermo Fisher Scientific, USA.

e o *pellet* de RNA foi hidratado com 1000,0 µL de etanol a 75%. As amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram secos a temperatura ambiente por 5 minutos e depois solubilizados em 20,0 µL de água ultra-pura DEPC⁴² mantidas por 10 minutos a 55°C. As amostras foram congeladas a -80°C para posterior síntese do DNA complementar (cDNA). A quantificação do RNA foi feita por espectrofotometria de luz UV utilizando-se a diluição 1:50 ou seja 2,0 µL RNA total foi diluído e 98,0 µL de água DEPC, as amostras foram lidas na absorbância 260/280 nm.

A confecção do cDNA foi realizada por meio da reação da transcriptase reversa, utilizando-se *Kit* comercial⁴³. O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 µg de RNA total, sendo adicionados, em cada amostra, reagentes desse *Kit*, incluindo 10,0 µL de 2xRT, 2,0 µL de RT e água (até completar 8,0 µL com o RNA), em um volume final de 20,0 µL. As amostras foram incubadas em termociclador, sendo os ciclos de 25 °C por 20 minutos, 42 °C por 50 minutos e 85 °C por 5 minutos. A seguir, adicionou-se 1,0 µL de RNase H, e as amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -20°C, até a realização da reação em cadeia de polimerase em tempo real.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o kit comercial *Power Syber green*⁴⁴, utilizando-se 2,5 µg de cDNA, 5pM de cada iniciador e 12,5 µL do reagente syber Green em um volume final de 25,0 µL de reação por poço, no aparelho *7500 Real Time PCR Sistem* (Applied Biosystems, USA). Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Os *primers* iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tab. 2). A expressão gênica foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *Rattus norvegicus*. Os níveis de expressão obtidos no grupo controle negativo foram utilizados como padrão de expressão no cálculo da expressão relativa de cada transcripto.

⁴² Ultra-pure® DEPC-treated water, Gibco, Invitrogen, USA.

⁴³ SuperScript® III, Platinum® Two-Step qRT-PCR, Invitrogen, USA.

⁴⁴ Power SYBR® Green PCR Master Mix, Invitrogen, USA.

Tabela 2. Genes com a respectiva sequência de nucleotídeos dos *primers* iniciadores para RT-PCR em tempo real.

| Gene | Número de Acesso | Sequência de oligonucleotídeos 5'-3' | Tamanho do produto |
|---------------|------------------|---|--------------------|
| IL-10 | NM_012854.2 | F: CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG R: CAGCTGTATCCAGAGGGTCTTCA | 64 |
| TNF- α | NM_012675.3 | F: AACACATCTCCCTCCGGAAA R: CCAGTTCCACATCTCGGATCA | 64 |
| IL-1 β | M98820 | F: TGACAGACCCCAAAGATTAAGG R: CTCATCTGGACAGCCCAAGTC | 61 |
| TGF- β | AY550025.1 | F: GAAACGGAAGCGCATCGA R: TGGCGAGCCTTAGTTTGGGA | 59 |
| BDNF | NM_012513.3 | F: CACAATGTTCCACCAGGTG R: TGGGCGCAGCCTTCAT | 89 |
| GDNF | EU068472 | F: GAGAGAGGAACCGGCAAGCT R: GCGACCTTTCCTCTGGAAT | 59 |
| VEGF | NC_013899.1 | F: AAATCCTGGAGCGTTCACCTGTG R: AACGCGAGTCTGTGTTTTTGC | 106 |
| GAPDH | NC_005103.3 | F: TGCACCACCAACTGCTTA R: GGATGCAGGGATGATGTTC | 97 |

5.11. Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com fatorial 3 x 5 (três grupos experimentais e cinco tempos de avaliação). Verificou-se a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk e as variâncias comparadas pelo teste F. Os dados que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [$x = \log(y + 1)$]. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para comparação entre as médias de expressão gênica e de densidade integrada de pixels entre os grupos experimentais, dois a dois, em um tempo de avaliação, os dados foram analisados pelo Teste *t* não pareado. Os escores da avaliação da capacidade motora foram comparados entre os grupos, dois a dois, pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

6. RESULTADOS

6.1. Isolamento, cultivo e expansão de CTM de tecido adiposo

O protocolo utilizado para isolamento, cultivo e expansão das CTM foi eficiente, permitiu a expansão das células e na quarta passagem obteve-se grande quantidade de células viáveis que foram suficientes para a condução do estudo. As CTM apresentaram morfologia alongada, fusiforme, semelhante à morfologia de fibroblastos.

6.2. Caracterização fenotípica das CTM

A caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo foi semelhante nas CTM antes do congelamento e após o descongelamento. Observou-se baixa expressão média dos marcadores CD45 ($4,93\pm 1,4$), CD34 ($4,83\pm 0,62$), CD11b/c ($5,37\pm 1,64$), MHC II ($9,1\pm 7,1$) e alta expressão média dos marcadores CD54 ($89,71\pm 9,55$), CD73 ($90,07\pm 5,25$), CD90 ($91,28\pm 6,5$) e MHC I ($92,69\pm 6,35$) (Fig.2).

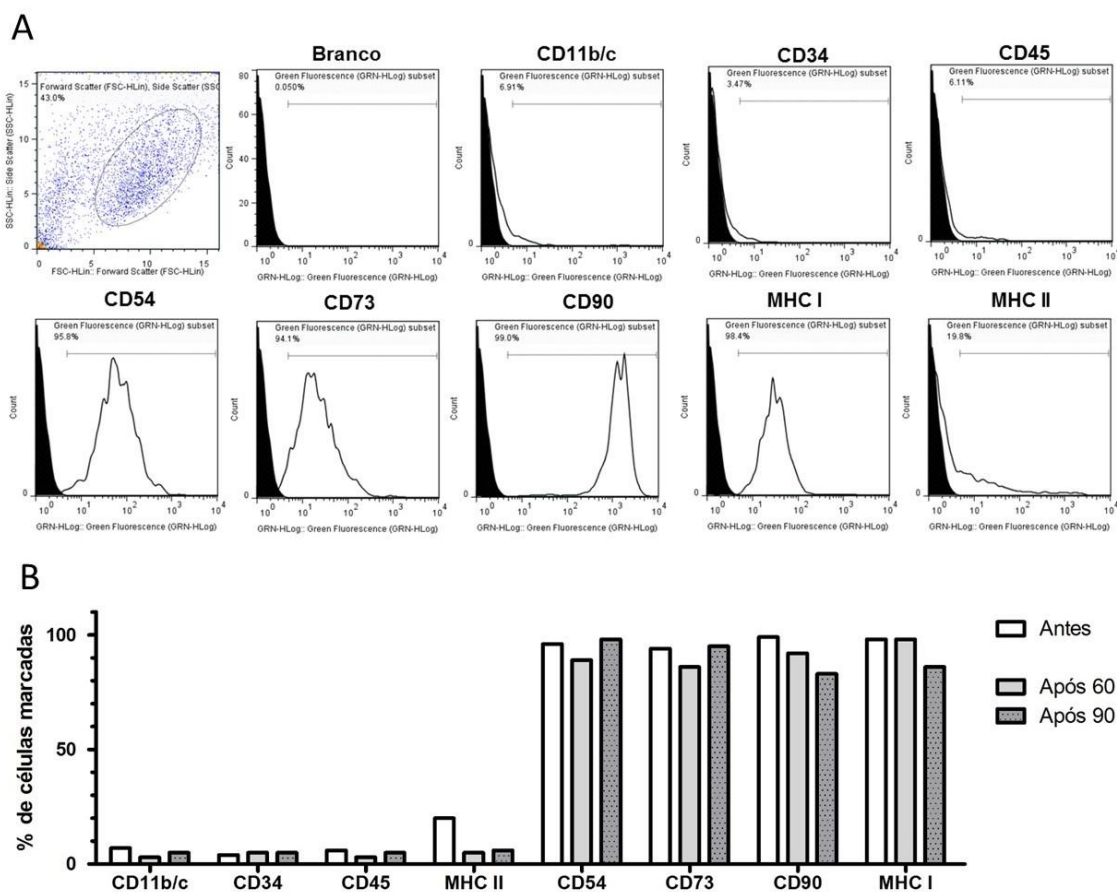


Figura 2. Análise imunofenotípica das CTM por meio de citometria de fluxo. A) Gráfico de tamanho *versus* granulosidade indica a população R1 escolhida para análise dos marcadores CD11, CD34, CD45, CD54, CD73, CD90, MHC-I, MHC-II. Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. Os resultados ilustram um evento da

cultura de CTM obtidas do tecido adiposo. O gráfico em branco representa a população de células avaliadas para um marcador específico (o deslocamento para direita indica a existência de marcação). B) Porcentagem de células que expressaram os marcadores CD11, CD34, CD45, CD54, CD73, CD90, MHC-I, MHC-II em culturas de CTM indiferenciadas antes do congelamento e após 60 e 90 dias de congelamento.

6.3. Comprovação do potencial de diferenciação das CTM

As CTM apresentaram a formação de nódulos de mineralização acobreados na coloração de *Von Kossa*, após serem cultivadas por 21 dias em meio osteogênico, caracterizando o processo de diferenciação osteogênica (Fig. 3A). Após 21 dias de cultivo em meio condrogênico foi possível observar a diferenciação das CTM em condroblastos com o acúmulo de proteoglicanos corados em azul pelo *Alcian Blue* no interior do citoplasma e na matriz extracelular (Fig. 3B). Verificou-se a formação de vesículas lipídicas com aspecto birrefringente e coloração avermelhada por *Oil Red* no interior do citoplasma das CTM após 21 dias de cultivo em meio adipogênico, o que caracterizou a diferenciação adipogênica dessas células (Fig. 3C).

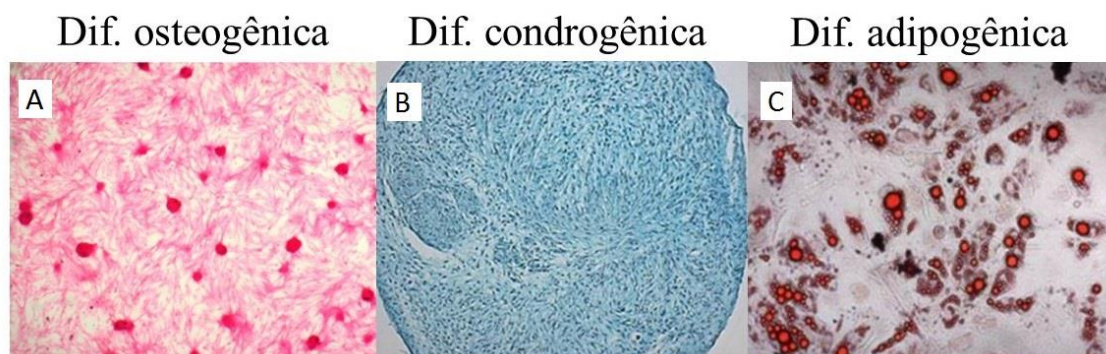


Figura 3. Cultura de CTM extraídas de tecido adiposo de ratos e submetidas à diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica por 21 dias: A) Na diferenciação osteogênica observou-se nódulos de mineralização acobreados corados pela técnica de *Von Kossa*; B) Na diferenciação condrogênica observou-se proteoglicanos corados em azul pelo *Alcian Blue*; C) Na diferenciação adipogênica observou-se vesículas lipídicas com aspecto birrefringente e coloração avermelhada no interior das células coradas pela técnica de *Oil Red*.

6.4. Avaliação da viabilidade celular pelo azul de tripan e conversão de MTT em cristais de formazan

A porcentagem de células viáveis foi de $97,03\% \pm 0,25$ antes do congelamento, $84,87 \pm 0,81$ após 60 dias de congelamento e $81,83 \pm 3,72$ após 90 dias de congelamento. Esses resultados mostram uma redução da viabilidade celular após o descongelamento. Não houve diferença na viabilidade celular entre os tempos de congelamento de 60 e 90 dias ($P < 0,05$) (Fig.4A).

A conversão de MTT em cristais de formazan foi superior nas culturas de CTM após 90 dias de congelamento em comparação com as culturas antes do congelamento ($P < 0,05$) (Fig.4B).

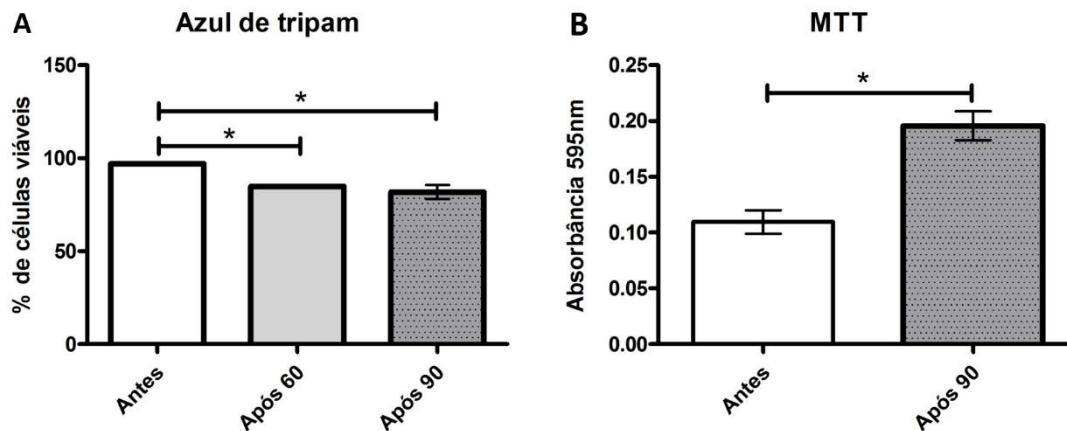


Figura 4. A) Médias e desvios padrão da porcentagem de células viáveis em culturas de CTM antes do congelamento e após 60 e 90 dias de congelamento ($P < 0,05$). B) Média e desvio padrão da conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM de tecido adiposo de ratos antes do congelamento e após 90 dias de congelamento ($P < 0,05$).

6.6. Pós-operatório e avaliação da função motora

Os animais não apresentaram sinais de dor nem complicações na ferida cirúrgica durante o pós-operatório. Todos os animais submetidos a trauma medular tiveram retenção urinária, e alguns tiveram hematúria.

Os animais do grupo controle negativo apresentaram escore 21 (escore máximo) em todos os tempos de avaliação. Os animais submetidos ao trauma tiveram escore 0 ou 1 no teste BBB no primeiro tempo de avaliação (24 horas). Não houve diferença significativa entre os escores obtidos nos grupos CTM e CP nos tempos de avaliação 24 ($0,60 \pm 0,55$; $0,40 \pm 0,55$) e 48 horas ($1,50 \pm 1,73$; $1,10 \pm 1,32$). Os escores foram maiores no grupo CTM do que no CP nos tempos de avaliação 72 horas ($5,00 \pm 2,62$; $1,4 \pm 1,14$), oito ($9,00 \pm 2,83$; $5,20 \pm 2,05$) e 21 dias ($9,50 \pm 1,92$; $6,00 \pm 1,41$) ($P < 0,05$) (Fig.5).

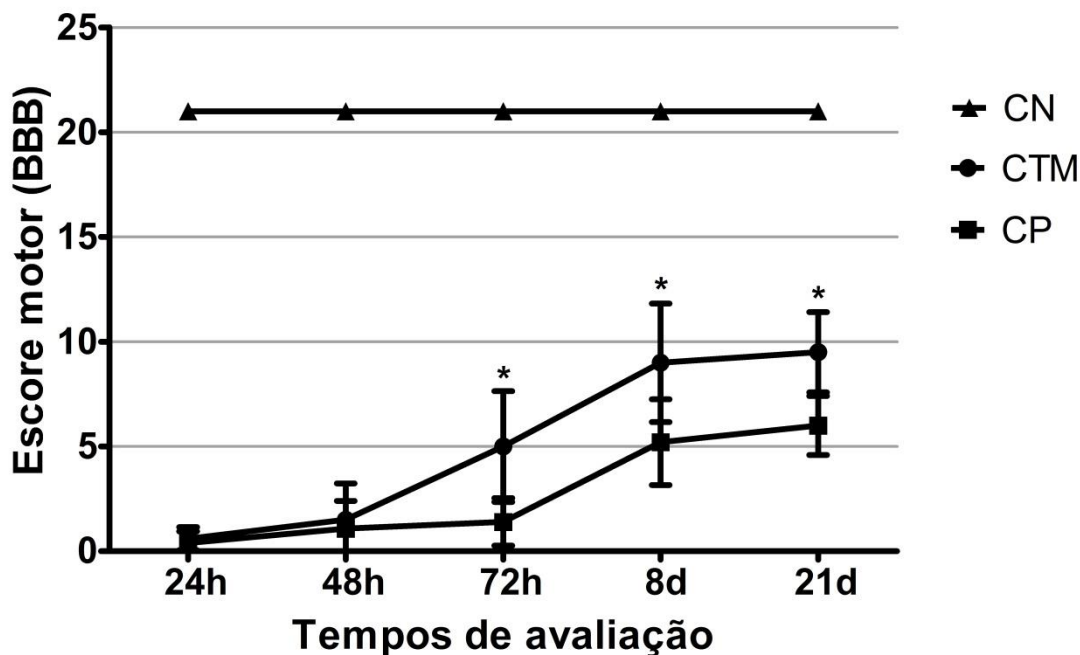


Figura 5. Médias e desvios padrão dos escores obtidos nas avaliações da função motora pelo método BBB nos animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP), avaliados às 24, 48, 72 horas e aos oito e 21 dias após trauma. As médias dos escores foram maiores no grupo CTM do que no CP nos tempos de avaliação 72 horas, oito e 21 dias (asteriscos) ($P < 0,05$).

6.7. Avaliação histopatológica

O tipo de lesão induzida pela compressão por balão foi semelhante em todos os animais submetidos ao trauma, independente do grupo. Nos cortes dos segmentos craniais encontraram-se secções de medula íntegra e, caudalmente, notaram-se regiões de malácia (cavitações) focal. Nos primeiros cortes as cavitações acometiam o funículo dorsal, e nos subseqüentes foram expandindo-se tornando-se cada vez mais extensas até acometer totalmente as substâncias branca e cinzenta. Prosseguindo com os cortes dos segmentos caudais, verificou-se processo inverso.

As secções das medulas dos animais do grupo CN apresentaram preservação da arquitetura normal. Observou-se a medula arredondada, envolvida pelas meninges, e no seu interior a substância cinzenta em formato de “H” circundada pela substância branca. No centro da substância cinzenta foi possível visualizar o canal ependimário (Fig. 6a). Os cornos dorsais e ventrais estavam normais, com corpos neuronais íntegros apresentando núcleo, nucléolo e substância de Nissl evidentes (Fig. 6b). Essas características mostraram que a realização de laminectomia não provocou lesão na medula espinhal.

Não houve diferença nas alterações histológicas observadas na região do epicentro dos grupos CTM e CP, nos tempos de avaliação oito e 21 dias. Nessa região as medulas apresentaram malácia difusa intensa acometendo toda substância branca e cinzenta (Fig. 6c).

No tempo de avaliação de oito dias, os cortes histológicos provenientes das regiões cranial e caudal dos grupos CTM e CP apresentaram áreas de malácia focalmente extensa, acometendo o funículo dorsal (Fig. 6d-g). Na substância cinzenta dos dois grupos foi possível encontrar alguns neurônios degenerados (Fig. 6h). Na substância branca ocorreu discreta degeneração axonal e tumefação de mielina, multifocal, acometendo o funículo dorsal ao redor da área de cavitação, e os funículos laterais na região adjacente aos cornos dorsais (Fig. 6i).

No tempo de avaliação 21 dias, os segmentos craniais e caudais das medulas dos animais dos grupos CTM e CP apresentaram região de malácia focalmente extensa acometendo funículo dorsal (Fig. 7a-d). A avaliação da substância cinzenta mostrou alguns neurônios em degeneração. Na substância branca ocorreu degeneração discreta a moderada, difusa, evidenciada pela tumefação axonal e da bainha de mielina. Esse achado foi mais intenso no grupo CP do que no CTM (Fig. 7e).

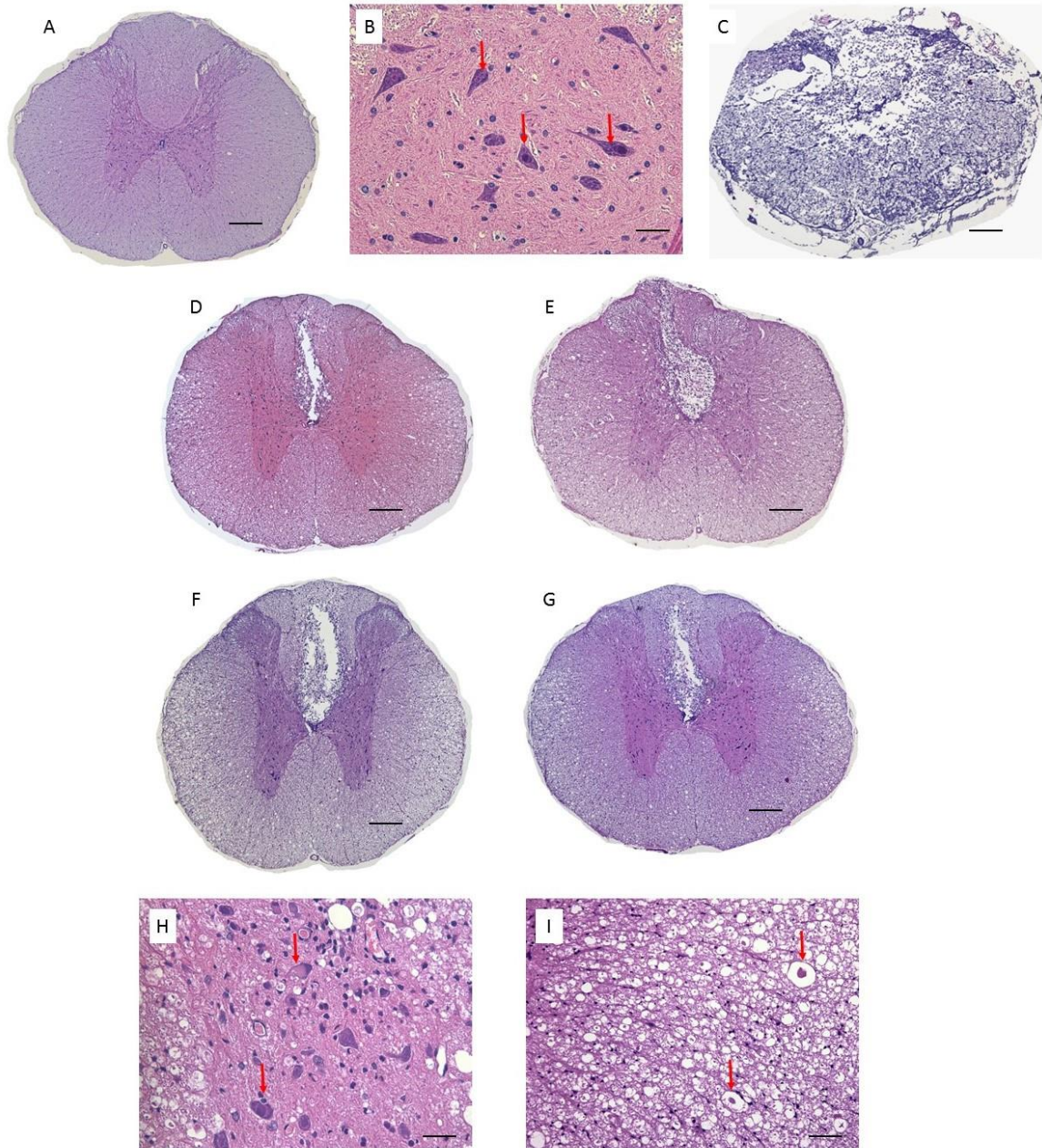


Figura 6. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos oito dias após a cirurgia de laminectomia e realização de trauma medular, coloração HE: A e B) Medula espinhal de animal submetido apenas à laminectomia (CN) na qual observa-se a arquitetura do tecido normal (A) e neurônios íntegros com substância de Nissl, núcleos e nucléolos evidentes (setas em B); C) Corte proveniente da região de epicentro de medula espinhal de animal submetido ao trauma apresentando malácia acometendo toda substância branca e cinzenta; D e E) Cortes provenientes das regiões cranial e caudal de medula espinhal de animal submetido a trauma e tratado com CTM; F e G) Cortes provenientes das regiões cranial e caudal de medula espinhal de animal submetido a trauma sem tratamento. Nos cortes histológicos provenientes das regiões craniais e caudais das medulas espinhais de animais submetidos a trauma observaram-se áreas de

malácia focalmente extensa acometendo o funículo dorsal e discreta degeneração axonal e tumefação de mielina acometendo os funículos dorsais e laterais. Nesses mesmos animais observaram-se: H) neurônios degenerados, com perda de substância de Nissl e núcleo deslocado para periferia (setas); I) degeneração de substância branca com tumefação de axônios e bainha de mielina (setas) (A, C, D, E, F, G: Barra = 285 μ m; B, H, I: Barra = 35 μ m).

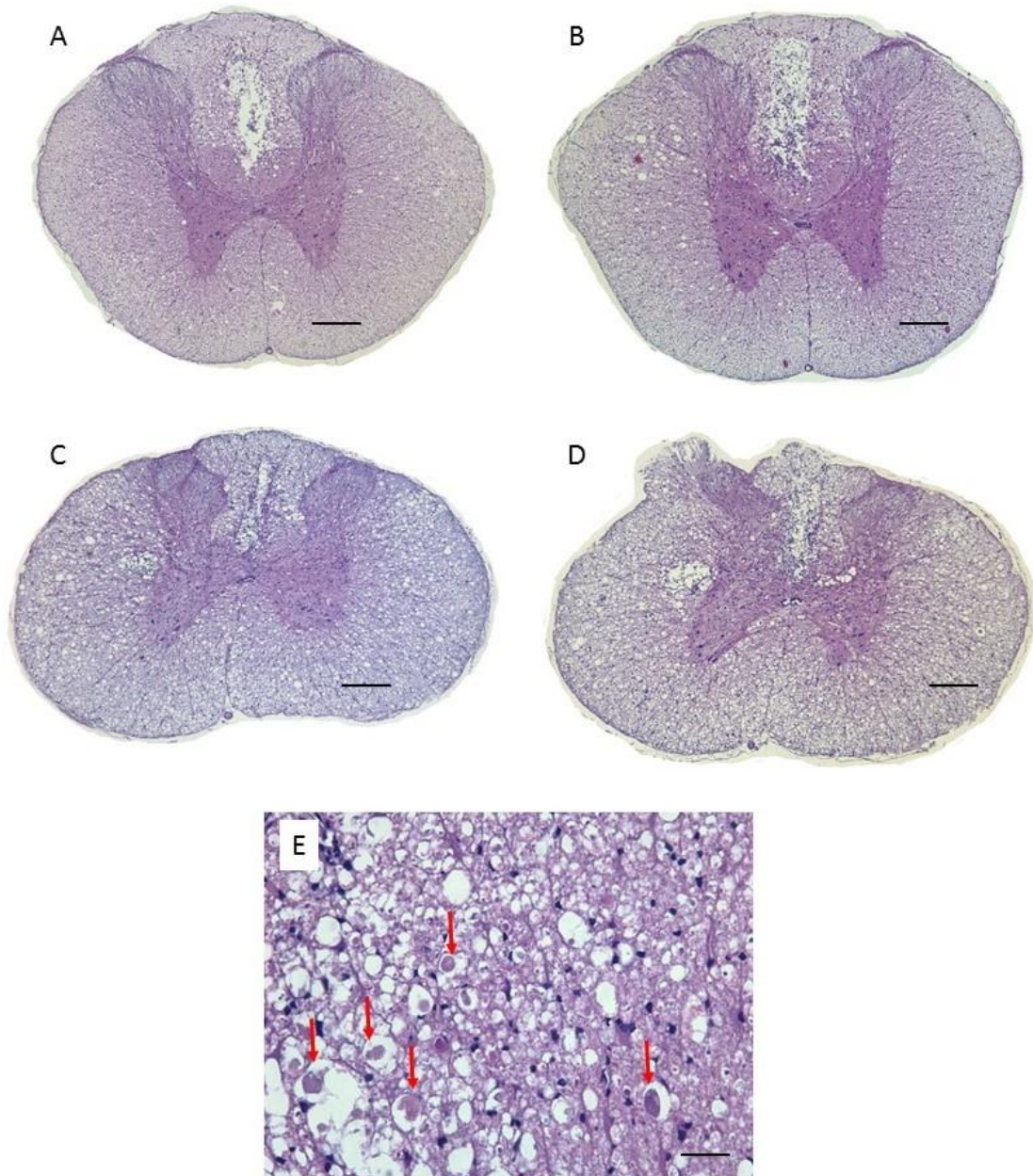


Figura 7. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos 21 dias após a cirurgia de laminectomia e realização de trauma medular, coloração HE: A e B) Cortes provenientes das regiões cranial e caudal de medula espinhal de animal submetido a trauma e tratado com CTM. C e D) Cortes provenientes das regiões cranial e caudal de medula espinhal de rato submetido a trauma sem tratamento. Nos cortes histológicos provenientes das regiões cranial

e caudal dos animais submetidos a trauma observou-se degeneração axonal e de mielina discreta a moderada, difusa, sendo menos intenso no grupo tratado com CTM. (E) Substância branca da medula espinhal de animal submetido a trauma apresentando moderada degeneração de axônios e bainha de mielina (setas). (A,B,C,D: Barra=285 μ m ; E: Barra=35 μ m).

6.8. Avaliação por imunistoquímica

A reação de imunistoquímica com anticorpo anti-eGFP permitiu visualizar as CTM na medula espinha 8 e 21 dias após sua administração. Foram identificadas CTM na substância cinzenta nos segmentos caudais e na região de malácia no epicentro da lesão (Fig. 8a,b).

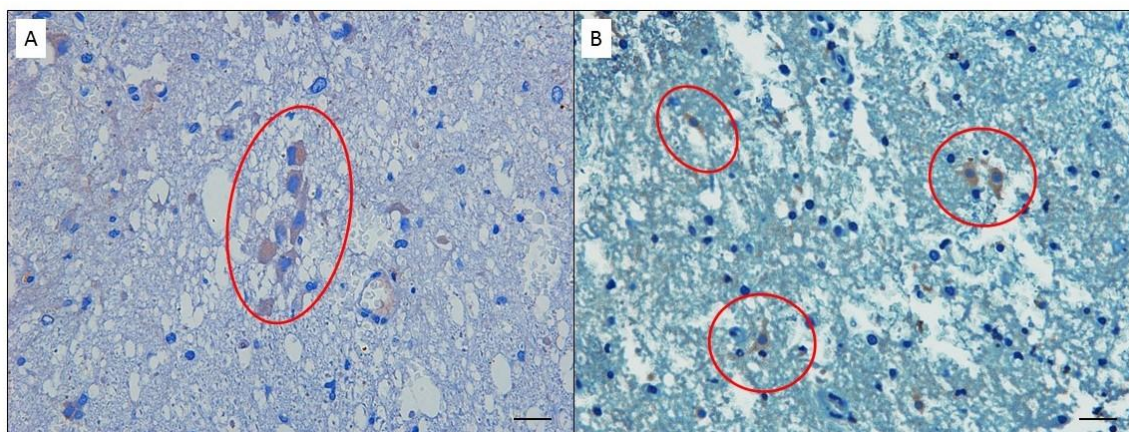


Figura 8. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos submetidos a trauma e tratados com CTM. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. Observar as CTM distribuídas na substância cinzenta (A) e na região de malácia (B); marcadas com anticorpo anti-eGFP (círculos vermelhos) (Barra = 23 μ m).

A marcação de células da micróglia ativadas e macrófagos pelo anticorpo CD68 foi pouco visível no grupo CN (Fig. 9a,b). Nas medulas de animais dos grupos CTM e CP observaram-se células marcadas na substância branca e cinzenta, com marcação mais intensa na região de malácia localizada no funículo dorsal (Fig. 9 c,d). A marcação foi citoplasmática não uniforme, pois em algumas células a intensidade foi maior que em outras.

Não houve diferença quanto à expressão de CD 68 no funículo dorsal entre os grupos CP ($12,91 \times 10^6 \pm 8,31 \times 10^6$) e CTM ($16,91 \times 10^6 \pm 10,67 \times 10^6$). A expressão de CD68 foi significativamente menor no grupo CN ($0,04 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$) do que no CTM e CP ($P < 0,05$) (Fig. 9a). Observou-se diferença entre os grupos quanto às características morfológicas das células marcadas. No grupo CTM as células eram maiores e com citoplasma espumoso, enquanto no grupo CP elas apresentaram citoplasma menor e mais denso (Fig. 9 e, f).

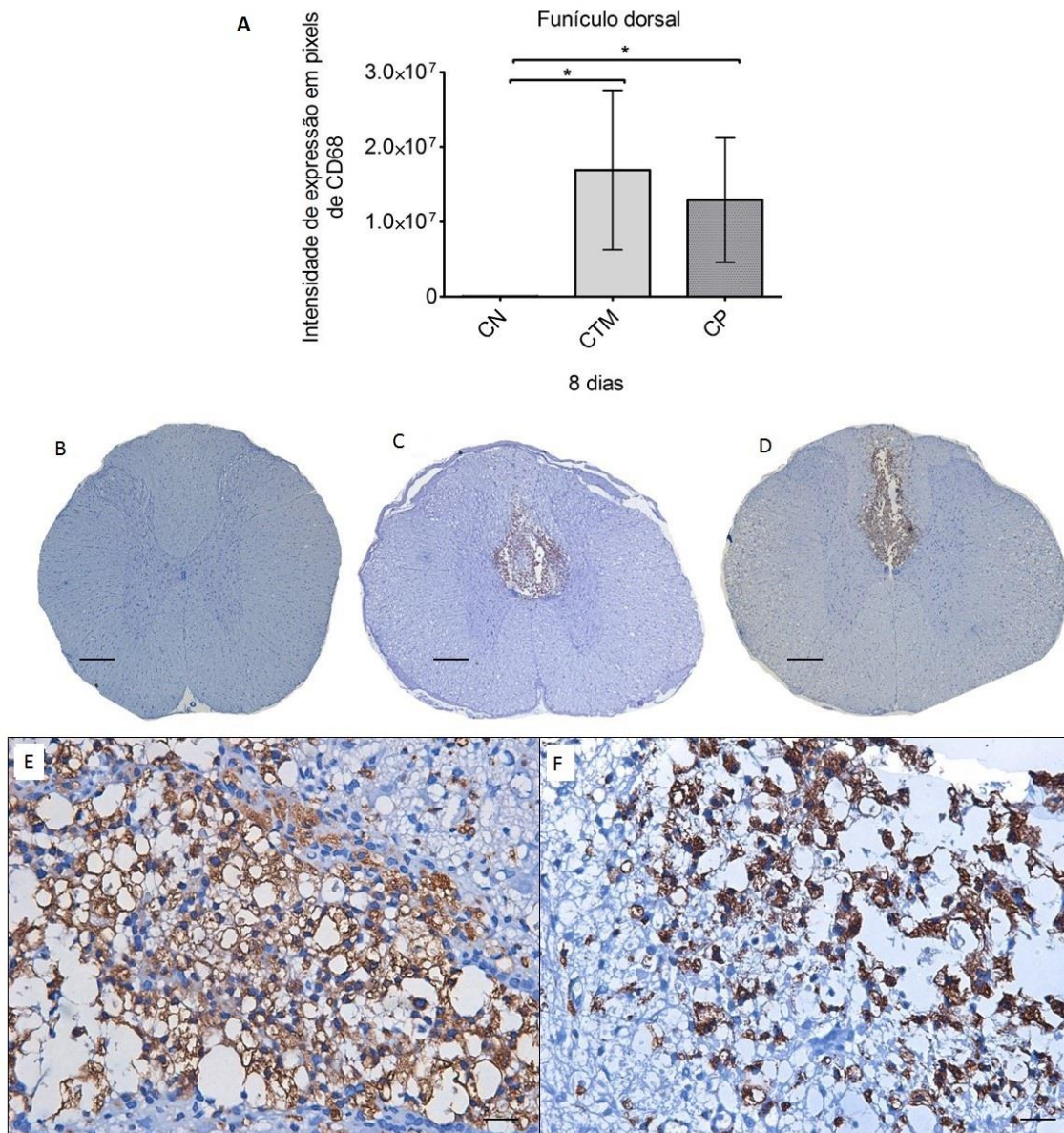


Figura 9. A) Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de CD68 na região de funículo dorsal das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP), avaliados oito dias após trauma ($P < 0,05$). Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinais de ratos oito dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunistoquímica com anticorpo CD68, com Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-coloração por hematoxilina de Harris. B) Medula espinal de animal submetido apenas a laminectomia, no qual a marcação pelo anticorpo CD68 foi pouco visível. Nas medulas de animais do grupo tratado com CTM (C) e controle positivo (D) a marcação foi mais intensa na região de malacia localizada no funículo dorsal. E) Região de funículo dorsal de medula espinal de animal tratado com CTM, observar que as células marcadas apresentam volume maior, com citoplasma menos denso. F) Região de funículo dorsal de medula espinal de animal submetido a trauma sem tratamento,

observar que as células marcadas apresentam menor volume e citoplasma mais denso (B,C,D:Barra=285 μm , E,F:Barra=35 μm).

No tempo de avaliação de oito dias, a média de intensidade de expressão em pixels do anticorpo CD68 na substância branca foi significativamente menor nos grupos CN ($0,05 \times 10^6 \pm 0,02 \times 10^6$) e CTM ($0,56 \times 10^6 \pm 0,39 \times 10^6$) comparado ao grupo CP ($2,92 \times 10^6 \pm 2,71 \times 10^6$) ($P < 0,05$) (Fig. 10a,d,f,h).

No tempo de avaliação de oito dias, a média de intensidade de expressão pixels do anticorpo CD68 na substância cinzenta foi significativamente menor nos grupos CN ($0,04 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$) e CTM ($1,84 \times 10^6 \pm 1,58 \times 10^6$) comparado ao grupo CP ($5,54 \times 10^6 \pm 4,24 \times 10^6$) ($P < 0,05$) (Fig. 10b,c,e,g).

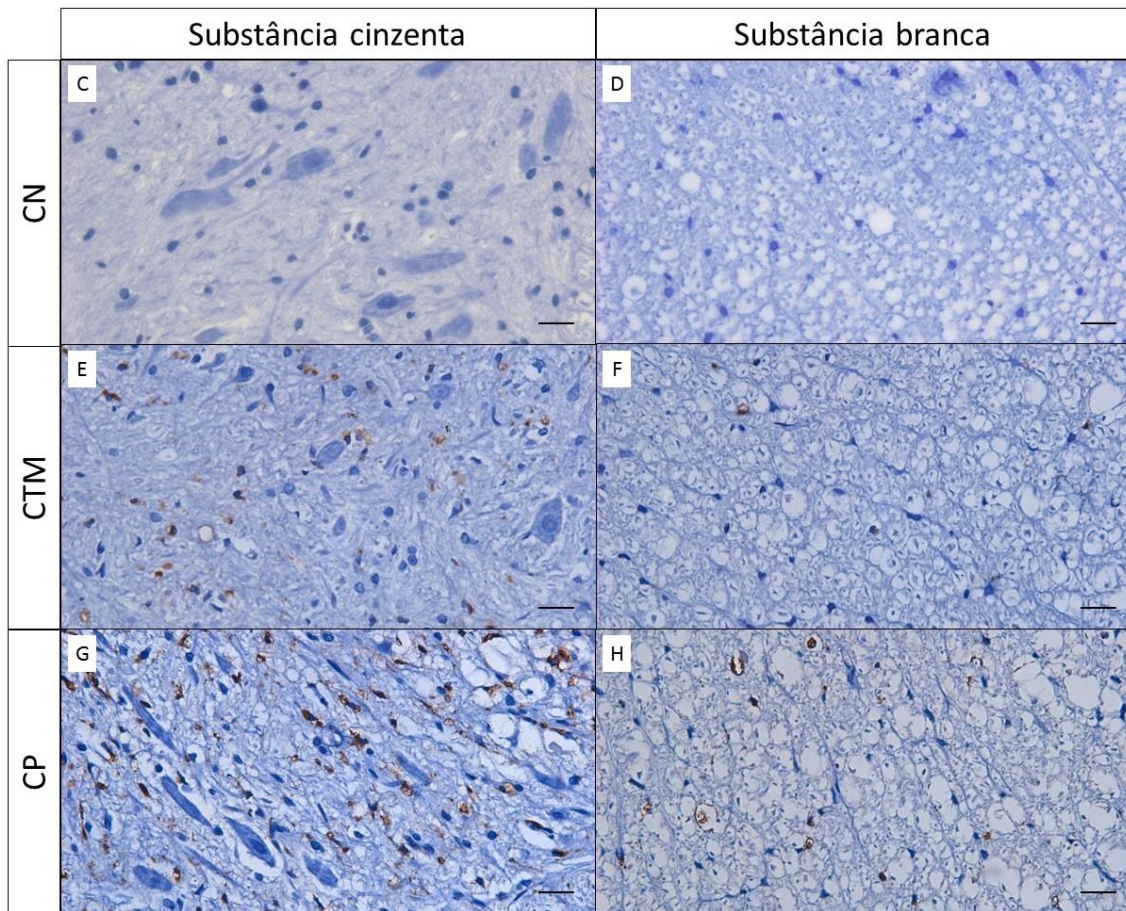
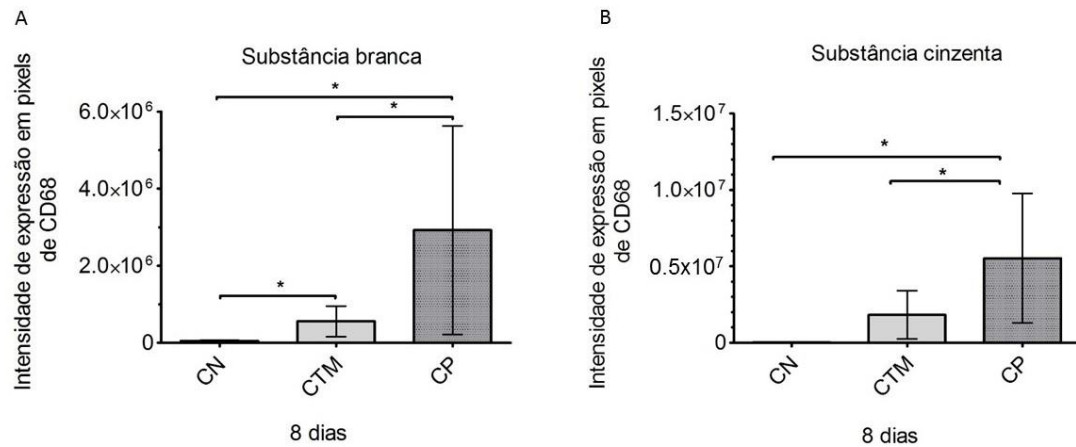


Figura 10. Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de CD68 nas substâncias branca (A) e cinzenta (B) das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados oito dias após trauma ($P < 0,05$). Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos oito dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunohistoquímica com anticorpo CD68, Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-coloração

por hematoxilina de Harris. Cortes provenientes da substância branca (C) e cinzenta (D) de um animal submetido à laminectomia, nos quais houve pouca marcação. Nas medulas espinhais dos animais do grupo tratado com CTM observou-se discreta marcação na substância branca (E) e cinzenta (F). Nas medulas espinhais dos animais submetidos a trauma sem tratamento observou-se marcação intensa na substância branca (G) e cinzenta (H) (Barra=35 μ m).

Na avaliação realizada 21 dias após trauma, não houve diferença entre as médias de expressão em intensidade de pixels do anticorpo CD68 na substância branca e cinzenta nos grupos CTM ($3,73 \times 10^6 \pm 3,61 \times 10^6$; $2,15 \times 10^6 \pm 1,91 \times 10^6$) e CP ($2,66 \times 10^6 \pm 1,66 \times 10^6$; $1,64 \times 10^6 \pm 1,45 \times 10^6$). A marcação nesses grupos foi maior do que no grupo CN ($0,74 \times 10^6 \pm 0,58 \times 10^6$; $0,04 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$) ($P < 0,05$) (Fig. 11a,b,c).

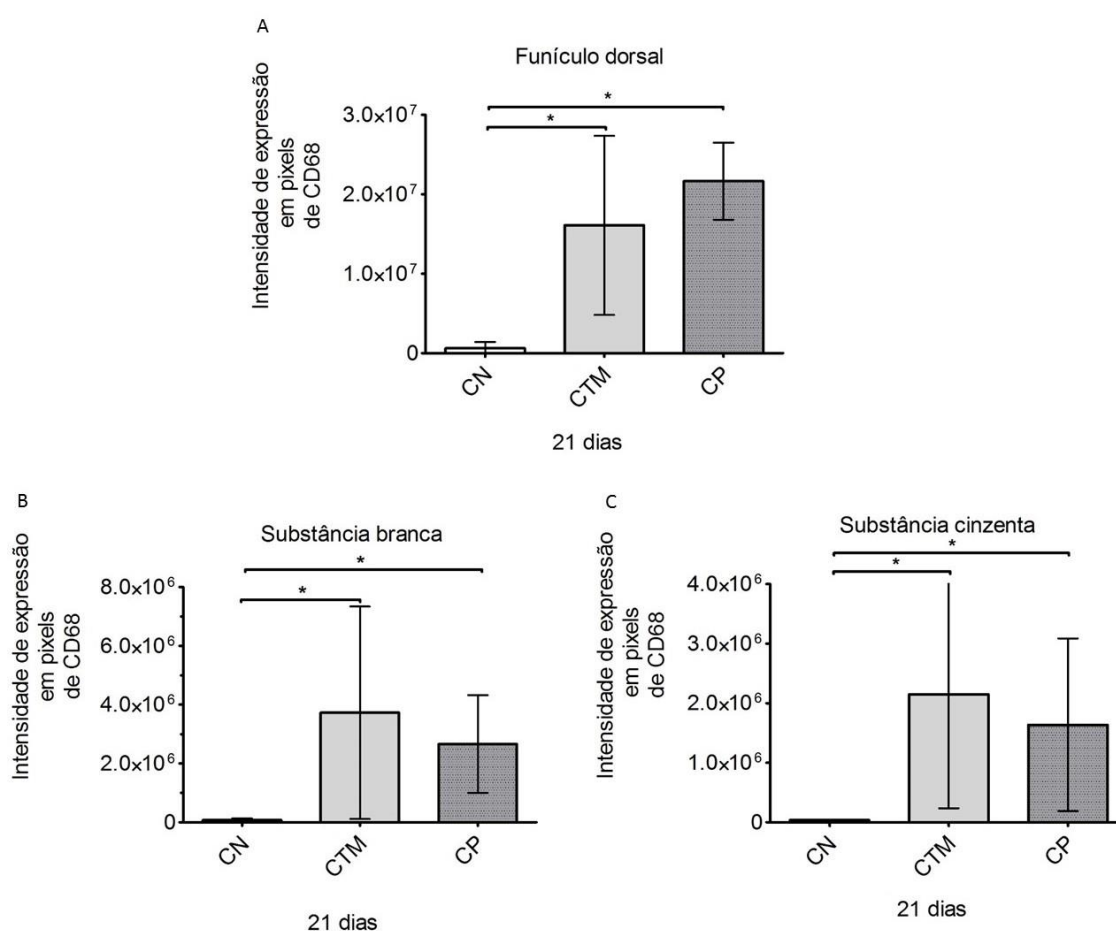


Figura 11. Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de CD68 nas no funículo dorsal (A) e nas substâncias branca (B) e cinzenta (C) das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados aos 21 dias após o trauma medular ($P < 0,05$).

Nas avaliações realizadas oito dias após o trauma com a marcação pelo anticorpo anti-NeuN, as medulas dos animais dos grupos CN e CP apresentaram marcação citoplasmática e nuclear, não

uniforme, pois haviam neurônios não marcados e outros marcados com diferentes intensidades (Fig. 12c,e). No grupo CTM os neurônios apresentaram marcação apenas citoplasmática (Fig. 12d). A média de intensidade de expressão em pixels para o anticorpo anti-NeuN foi significativamente maior no grupo CN ($1,67 \times 10^7 \pm 0,91 \times 10^7$), seguida pelo grupo CP ($0,98 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$) e finalmente pelo CTM ($0,28 \times 10^7 \pm 0,20 \times 10^7$) que apresentou a menor marcação ($P < 0,05$) (Fig. 12a).

Nas avaliações 21 dias após trauma, a marcação do grupo CTM tornou-se citoplasmática e nuclear, assim como nos grupos CN e CP (Fig. 12f, g e h). A média de intensidade de expressão em pixels do anticorpo NeuN foi significativamente maior nos grupos CN ($1,67 \times 10^7 \pm 0,91 \times 10^7$) e CTM ($1,69 \times 10^7 \pm 0,83 \times 10^7$) que no CP ($0,80 \times 10^7 \pm 0,38 \times 10^7$) ($P < 0,05$) (Fig. 12b).

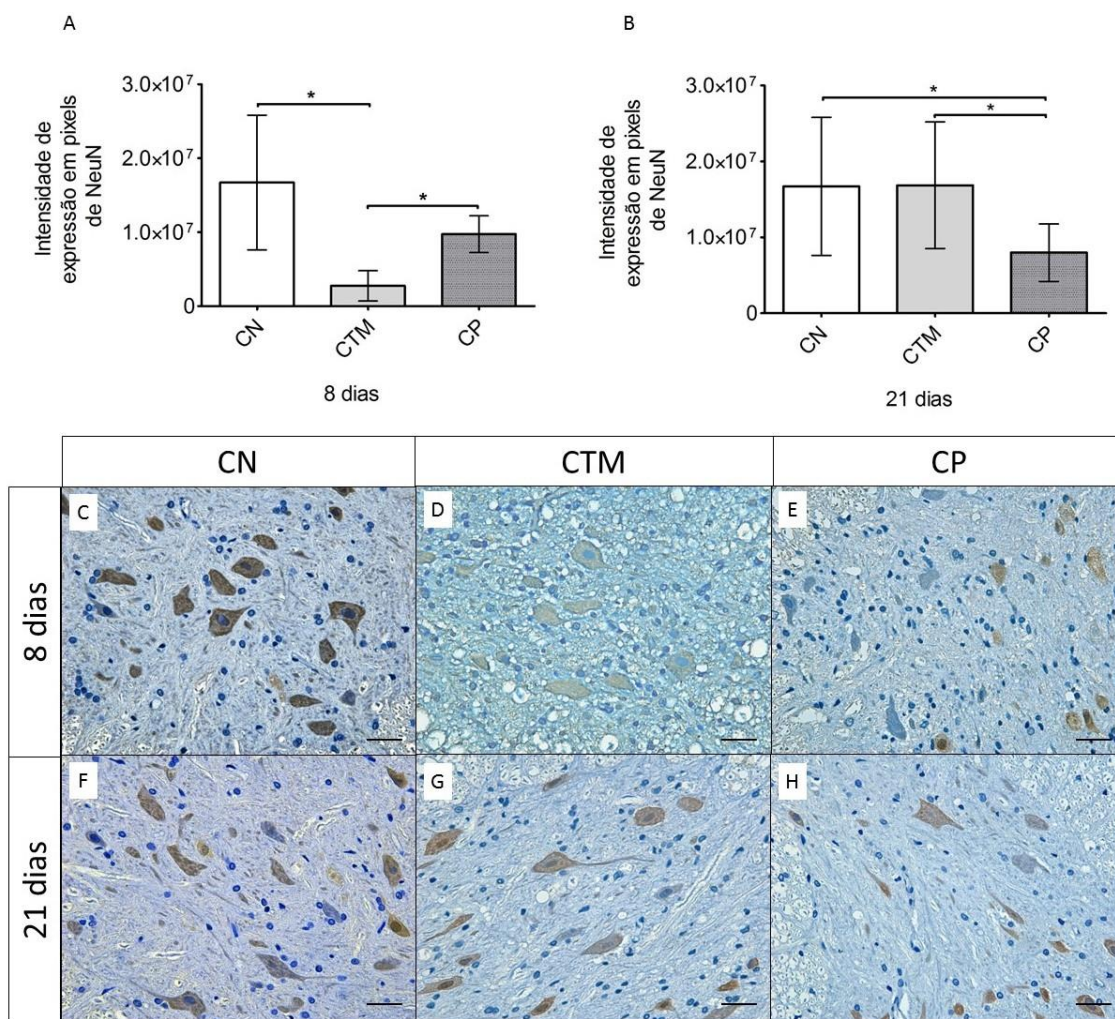


Figura 12. Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de NeuN nas medulas espinhais de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) nos tempos de avaliação oito (A) e 21 (B) dias ($P < 0,05$). Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos oito e 21 dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunistoquímica com anticorpo, anti-NeuN com Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-

coloração por hematoxilina de Harris. Oito dias após trauma observou-se marcação pelo anticorpo anti-NeuN mais intensa nas medulas espinhais dos animais do grupo controle negativo (C), seguida pelo grupo controle positivo (D) e o grupo tratado com CTM apresentou a menor marcação (D). No tempo de avaliação 21 dias após trauma a marcação pelo anticorpo NeuN foi maior nos grupos controle negativo (F) e tratado com CTM (G) que no controle positivo (H) (C,D,E,F,G,H:Barra=35 μ m).

A marcação dos prolongamentos de astrócitos pelo anticorpo GFAP nas medulas de animais dos grupos CN, CTM e CP, nos tempos de avaliação oito e 21 dias, foi citoplasmática. Essa marcação não foi uniforme, pois a distribuição dos prolongamentos marcados variou entre substância branca e cinzenta (Fig. 13 b,c,d).

Na avaliação realizada oito dias após trauma, quando comparadas as médias obtidas apenas no funículo dorsal observou-se maior expressão no grupo CP ($1,34 \times 10^7 \pm 0,67 \times 10^7$) do que no CN ($0,52 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$) e CTM ($0,14 \times 10^7 \pm 0,06 \times 10^7$). O grupo CTM apresentou a menor marcação ($P < 0,05$) (Fig. 13a,e,f,g). Não houve diferença nas expressões na substância branca e cinzenta, no tempo de avaliação oito dias entre os grupos CN ($1,80 \times 10^7 \pm 0,64 \times 10^7$; $1,01 \times 10^7 \pm 0,75 \times 10^7$), CTM ($1,79 \times 10^7 \pm 0,33 \times 10^7$; $1,90 \times 10^7 \pm 0,34 \times 10^7$) e CP ($1,76 \times 10^7 \pm 0,40 \times 10^7$; $2,02 \times 10^7 \pm 0,57 \times 10^7$) ($P < 0,05$) (Fig. 14a,b).

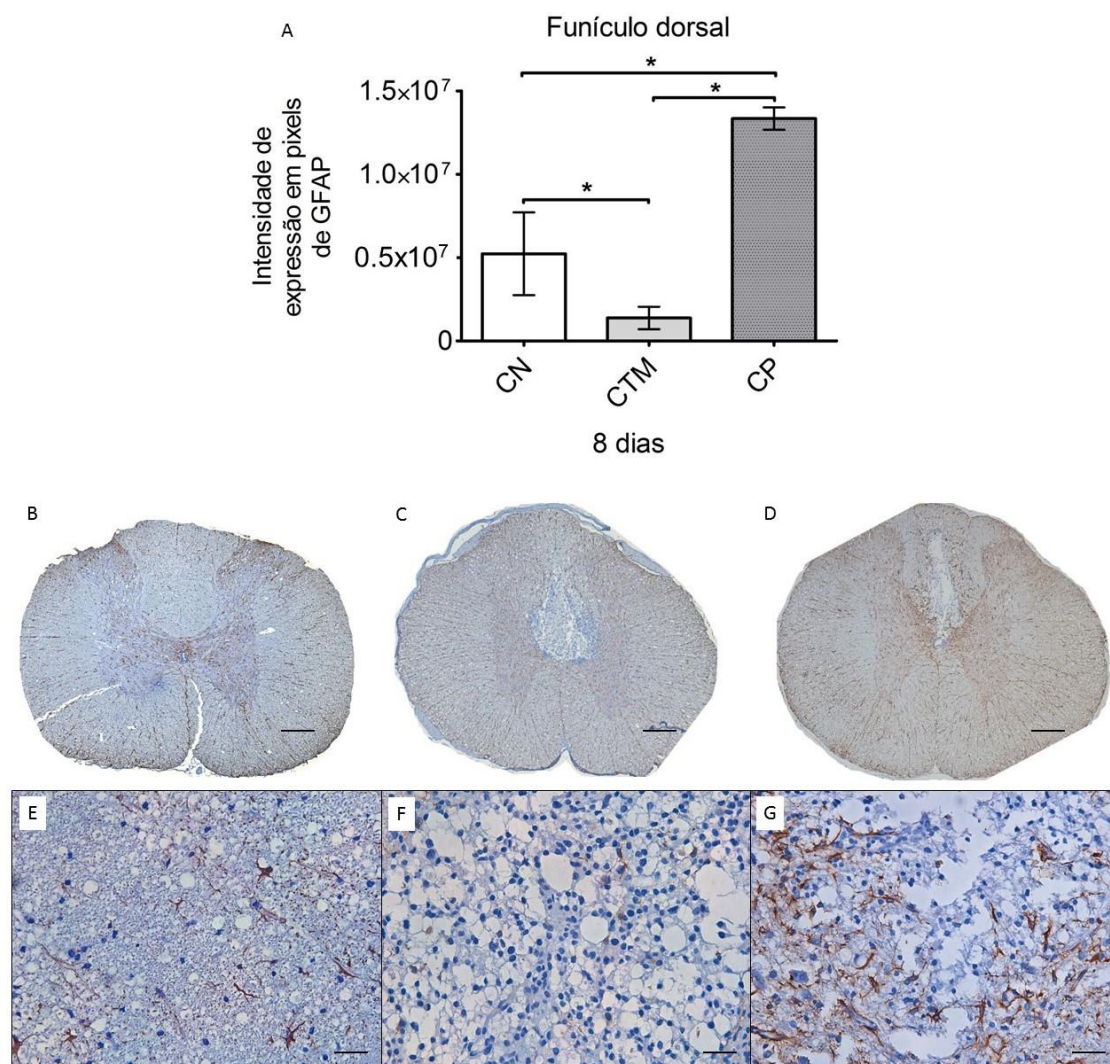


Figura 13. A) Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de GFAP na região de funículo dorsal das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados aos oito dias após o trauma medular ($P < 0,05$). Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos oito dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunistoquímica com anticorpo, anti-GFAP com Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-coloração por hematoxilina de Harris. Nos cortes histológicos provenientes das medulas espinhais de animais submetidos à laminectomia (B), tratados com CTM (C), e sem tratamento (D) observou-se marcação dos prolongamentos de astrócitos pelo anticorpo GFAP na substância branca e cinzenta. Nas regiões de funículo dorsal observou-se marcação menos intensa no grupo tratado com CTM (F) seguida pelo grupo controle negativo (E) e pelo controle positivo (G) no qual houve a maior marcação (B,C,D: Barra=285 μ m; E,F,G: Barra=35 μ m).

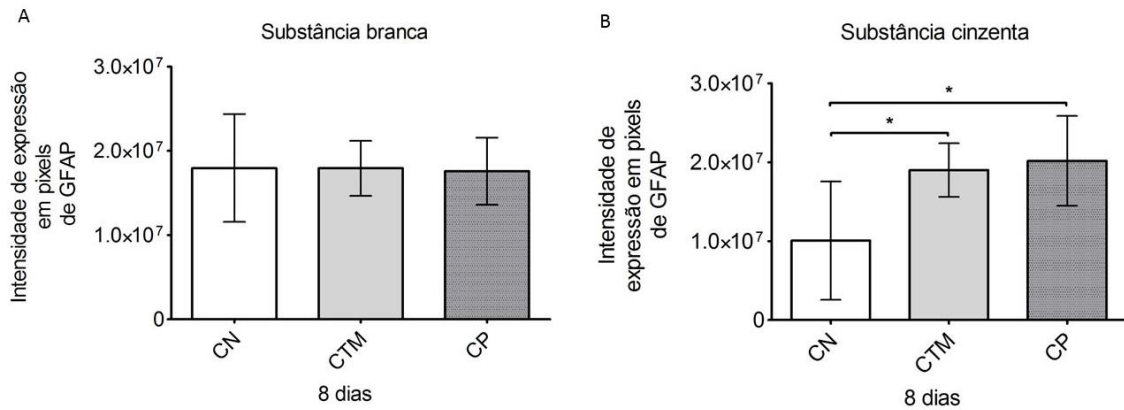


Figura 14. Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de GFAP nas substâncias branca (A) e cinzenta (B) das medulas de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados aos oito dias após o trauma medular ($P < 0,05$).

No tempo de avaliação 21 dias, as médias de intensidade de expressão em pixels de GFAP obtidas na substância branca não houve diferença entre os grupos CN ($1,80 \times 10^7 \pm 0,64 \times 10^7$), CTM ($1,61 \times 10^7 \pm 0,29 \times 10^7$) e CP ($1,59 \times 10^7 \pm 0,34 \times 10^7$) (Fig. 15a). Já na substância cinzenta a média de intensidade de expressão em pixels de GFAP foi maior no grupo CP ($1,73 \times 10^7 \pm 0,49 \times 10^7$) que no CTM ($1,06 \times 10^7 \pm 0,52 \times 10^7$) e CN ($1,01 \times 10^7 \pm 0,75 \times 10^7$) ($P < 0,05$) (Fig. 15b,d,e,f). Quando avaliado somente no funículo dorsal a média de intensidade de expressão em pixels foi maior nos grupos CP ($1,37 \times 10^7 \pm 0,91 \times 10^7$) e CTM ($1,43 \times 10^7 \pm 0,60 \times 10^7$) do que no CN ($0,52 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$) (Fig. 15c).

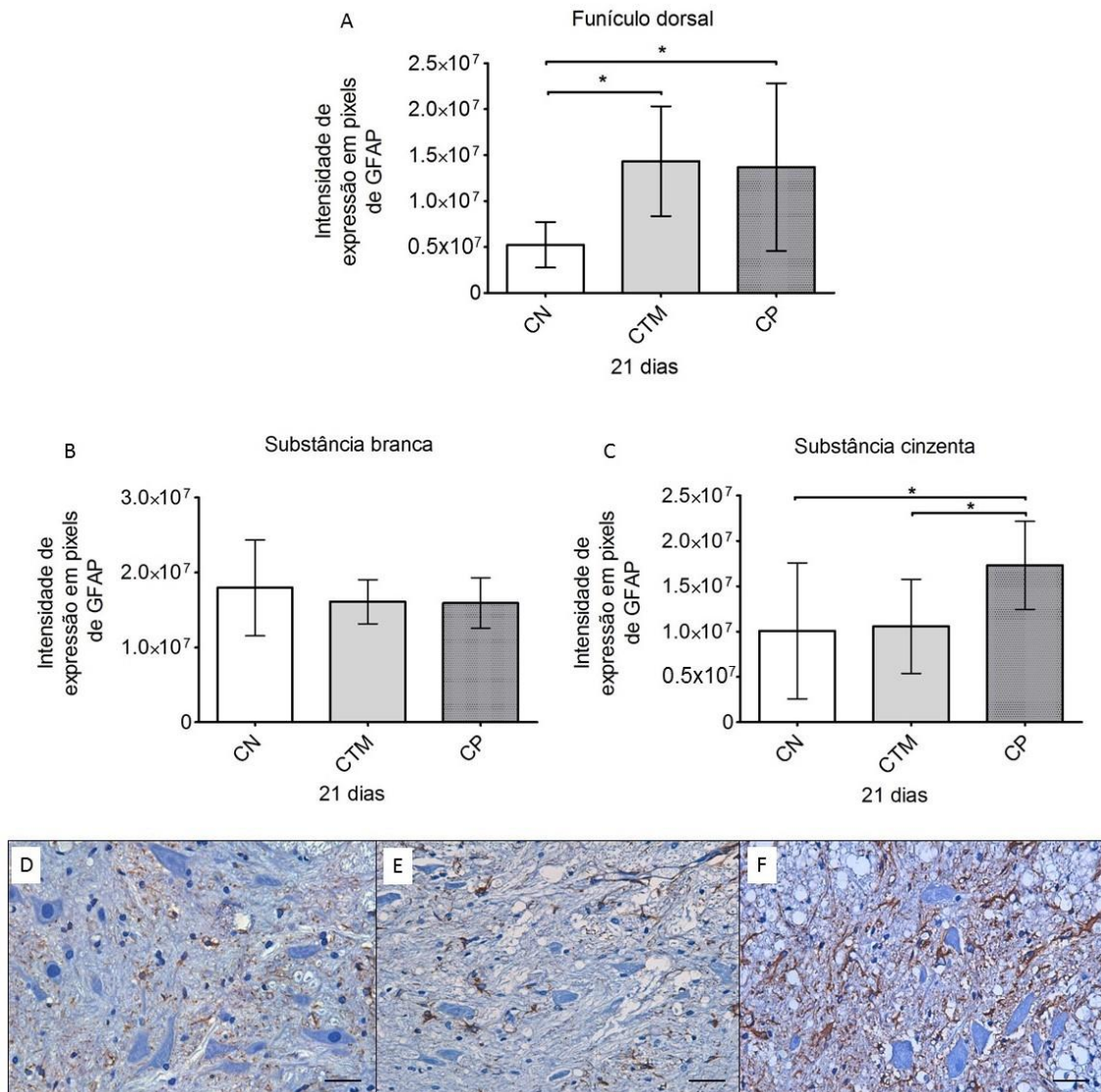


Figura 15. Médias e desvios padrão de intensidade de expressão em pixels de GFAP no funículo dorsal (A) e nas substâncias branca (B) e cinzenta (C) das medulas espinhais de animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP) avaliados aos 21 dias após o trauma medular ($P < 0,05$). Fotomicroscopias de cortes histológicos provenientes de medulas espinhais de ratos 21 dias após cirurgia de laminectomia e trauma medular. Os cortes foram processados pela técnica de imunistoquímica com anticorpo, anti-GFAP com Estreptavidina-biotina-peroxidase, e contra-coloração por hematoxilina de Harris. Observou-se que a marcação pelo anticorpo anti-GFAP na substância cinzenta foi menos intensa nos grupos controle negativo (D) e tratado com CTM (E) do que no grupo controle positivo (F) (A,B,C:Barra=35 μ m).

6.9. Avaliação da expressão relativa de citocinas anti-inflamatórias e pró -inflamatórias

A expressão relativa de IL-10 foi significativamente maior no grupo CTM (7,57±1,88) que no CP (2,54±0,79) 24 horas pós-trauma. Não foram observadas diferenças significativas entre CTM e CP nos tempos de avaliação 48 horas (1,56±0,67; 1,48±1,09), 72 horas (1,13±0,43; 2,42±1,45), oito dias (0,18±0,17; 0,26±0,28) e 21 dias (0,04±0,03; 0,08±0,02) (P<0,05) (Fig. 16a).

A expressão relativa de TNF- α foi menor no grupo CTM do que no CP nos tempos de avaliação oito (0,51±0,31; 1,72±1,38) e 21 dias (1,05±0,31; 2,94±1,32) (P<0,05). Não houve diferença na expressão relativa de TNF- α entre os grupos nos tempos de avaliação 24 horas (4,03±3,83; 6,25±4,54), 48 horas (4,17±1,04; 4,25±0,82) e 72 horas (2,56±2,20; 4,94±2,68) após o trauma medular (P<0,05) (Fig. 16b).

Não houve diferença da expressão relativa de IL-1 β entre os grupos CTM e CP, nos tempos de avaliação 24 horas (20,07±9,28; 20,51±15,19), 48 horas (4,07±2,58; 2,48±1,04) e 72 horas (3,01±1,76; 3,25±1,67), oito dias (1,32±1,09; 2,18±1,03) e 21 dias (10,60±2,63; 8,70±2,06) (P<0,05) (Fig. 16c).

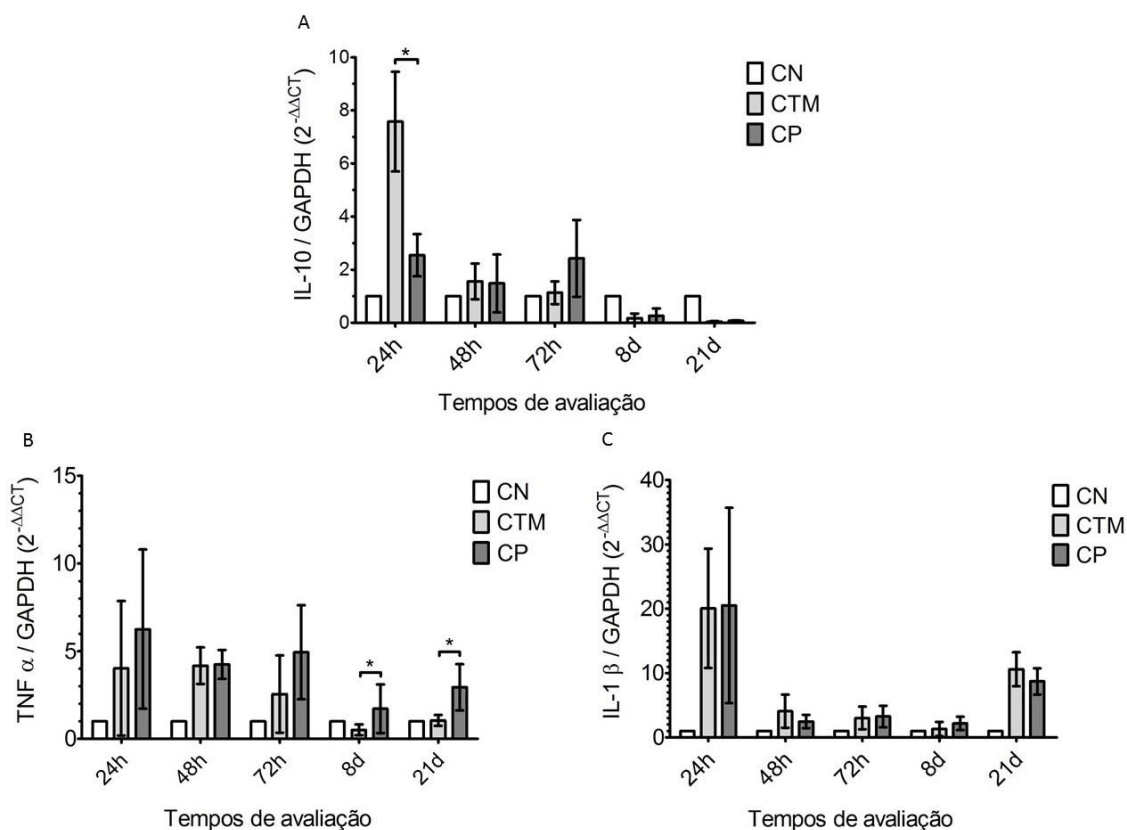


Figura 16. Médias e desvios padrão das expressões relativas de (A) IL-10, (B) TNF- α e (C) IL-1 β nos animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP), avaliados às 24, 48, 72 horas e aos oito e 21 dias após o trauma medular (P<0,05).

6.8. Avaliação da expressão relativa de fatores neurotróficos

A expressão relativa de TGF- β foi significativamente menor no grupo CTM que no CP 24 horas ($2,53\pm 0,40$; $10,31\pm 4,57$) e 21 dias ($4,03\pm 2,34$; $7,14\pm 1,58$) após trauma. Não houve diferença entre os grupos CTM e CP, nos tempos de avaliação 48 horas ($3,90\pm 2,99$; $2,89\pm 1,68$), 72 horas ($2,90\pm 0,74$; $3,92\pm 2,26$) e oito dias ($15,35\pm 12,88$; $11,84\pm 7,58$) após o trauma medular ($P<0,05$) (Fig. 17a).

Não houve diferença entre a expressão relativa de BDNF obtida nos grupos CTM e CP, 24 horas ($1,09\pm 0,43$; $0,87\pm 0,32$), 48 horas ($0,71\pm 0,20$; $0,60\pm 0,25$), 72 horas ($0,25\pm 0,20$; $0,16$; $0,06$), oito dias ($0,11\pm 0,04$; $0,10\pm 0,03$) e 21 dias ($0,42\pm 0,33$; $0,24\pm 0,15$) após o trauma medular ($P<0,05$) (Fig. 17b).

A expressão relativa de GDNF foi significativamente maior no grupo CTM que no CP nos tempos 48 horas ($24,45\pm 15,38$; $8,22\pm 4,19$) e oito dias ($1,42\pm 0,62$; $0,38\pm 0,12$) após o trauma medular. Não existiu diferença entre os grupos CTM e CP, 24 horas ($9,78\pm 2,55$; $5,87\pm 3,18$), 72 horas ($2,21\pm 1,48$; $2,48\pm 1,71$) e 21 dias ($0,02\pm 0,01$; $0,05\pm 0,02$) após o trauma medular ($P<0,05$) (Fig. 17c).

A expressão relativa de VEGF foi significativamente maior no grupo CTM comparado ao CP no tempo de avaliação 21 dias após o trauma medular ($1,78\pm 0,15$; $0,95\pm 0,33$) ($P<0,05$). Não houve diferença na expressão de VEGF entre os grupos CTM e CP nos tempos de avaliação 24 horas ($1,20\pm 0,16$; $0,98\pm 0,37$), 48 horas ($0,13\pm 0,4$; $0,11\pm 0,07$) 72 horas ($0,11\pm 0,06$; $0,07\pm 0,03$) e oito dias ($0,22\pm 0,15$; $0,19\pm 0,06$) ($P<0,05$) (Fig. 17d).

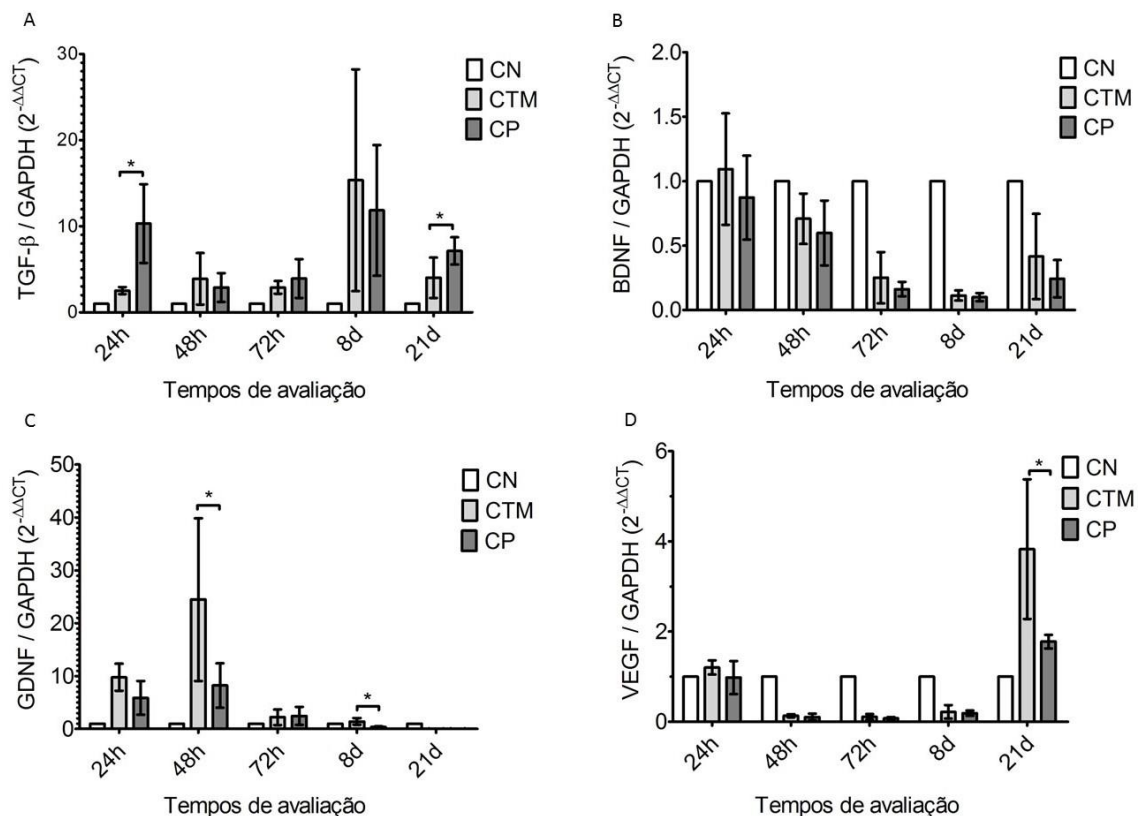


Figura 17. Médias e desvios padrão das expressões relativas de (A) TGF- β , (B) BDNF, (C) GDNF e (D) VEGF nos animais dos grupos controle negativo (CN), tratado com células tronco mesenquimais (CTM) e controle positivo (CP), avaliados às 24, 48, 72 horas e aos oito e 21 dias após o trauma medular ($P < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

O modelo de trauma de medula espinhal por compressão com balão foi escolhido para ser utilizado nesse trabalho por ser uma técnica de simples execução, que não necessita de aparelhos de alto custo e que pode ser facilmente reproduzida em outras pesquisas. Adicionalmente, esse método permite a realização do trauma de medula espinhal com laminectomia fora do epicentro da lesão, ou seja, ele exclui o efeito terapêutico da laminectomia que permite a expansão da medula edemaciada após o trauma. Dessa forma, esse modelo reproduz o mecanismo de trauma mais frequente na medicina veterinária que é o provocado por doenças de disco intervertebral (Olby, 2010; Spitzbarth et al., 2011).

O escore máximo (21) apresentado por todos os animais do grupo controle negativo, indica que a laminectomia não provocou lesão da medula espinhal. Já nos animais submetidos a trauma medular, a ausência de movimento ou discreta movimentação de uma articulação (escore 0 e 1) observadas na primeira avaliação mostrou que a lesão foi de intensidade grave. O modelo de trauma medular com o catéter de Fogarty preenchido com 30 μ l já foi utilizado com sucesso para induzir lesão grave (Martin et al., 1992), o que representa a realidade da neurologia no pronto

atendimento, em que a maioria dos pacientes são acometidos por lesão com essa intensidade (Olby, 2010; Spitzbarth et al., 2011).

Embora todos os animais apresentassem retenção urinária após o trauma, e alguns hematuria, a realização de esvaziamento vesical durante o pós-operatório foi suficiente para prevenir complicações ligadas a retenção urinária e proporcionar conforto aos animais. A retenção urinária e hematuria são as alterações mais frequentes em animais e humanos com lesão de medula espinhal. Elas são as principais responsáveis pelos casos de hospitalização desses pacientes para acompanhamento e tratamento com a finalidade de evitar complicações como cistite, infecções ascendentes do trato urinário e até a falência renal (Sekhon e Fehlings, 2001; Olby, 2010).

A ausência de sinais de dor após a cirurgia mostrou que os protocolos anestésicos e analgésicos foram eficientes no controle da dor dando um conforto no pós-operatório de todos os animais. A cicatrização da ferida cirúrgica e ausência de complicações na região operada durante o pós-operatório mostrou que os procedimentos cirúrgicos foram bem planejados e executados sob rigorosos critérios de assepsia. A uniformidade na conduta e nos cuidados pré, trans e pós-operatórios são indispensáveis para a condução de qualquer estudo visto que sem ela fatores externos podem influenciar os resultados alterando os efeitos dos tratamentos.

No presente trabalho, os critérios definidos pela *International Society for Cellular Therapy* para classificação de uma célula como CTM foram alcançados (Dominici et al. 2006; Dariolli et al., 2013; Baer, 2014). Dentre eles destacam-se a morfologia das CTM em cultura com forma alongada semelhante a fibroblasto e a capacidade de diferenciação dessas células em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Outro fator que assegura o isolamento de CTM neste estudo é a alta expressão dos marcadores CD54, CD73, CD90 e MHC I, mundialmente aceitos como marcadores de células tronco mesenquimais e relatado em outros estudos semelhantes (Dominici et al. 2006, Puntos et al., 2007, Schaffler e Buchler 2007, Lindner et al. 2010; Baer, 2014). A baixa expressão dos marcadores de células hematopoiéticas CD45, CD34, CD11b/c e MHC II observados nas CTM reafirma o isolamento dessas células a partir de amostras de tecido adiposo.

Assim como o realizado no presente estudo, a quarta passagem é considerada o melhor momento para a criopreservação das CTM, visto que as elas estão em alta taxa de divisão celular e baixa senescência (Dariolli et al., 2013; Zhu et al., 2013). A ausência de variação significativa nas expressões dos marcadores de superfície, bem como a manutenção dos potenciais de diferenciação após o descongelamento mostram que as CTM preservaram suas características fenotípicas e de diferenciação após a criopreservação. Davies et al., (2014), Dariolli et al., (20013) e Zhu et al. (2013) também observaram que o processo de criopreservação de CTM por até 12 meses não alterou a expressão de marcadores de superfície das células nem a sua capacidade de expansão e diferenciação em cultivo.

O número de células utilizadas na administração foi definido baseado em estudo prévio que demonstrou CTM na medula espinhal após a administração de 1×10^6 células por via endovenosa (Shin et al., 2013). No presente estudo a redução da viabilidade das CTM após a criopreservação não alterou o número de células viáveis administradas, uma vez que todas as amostras foram avaliadas antes da aplicação e que o cálculo do número de células a ser transplantadas baseou-se no número de células viáveis. Apesar da redução da viabilidade observada no presente estudo houve maior conversão de MTT nas CTM após o descongelamento. Este evento sugere um aumento na atividade mitocondrial dessas células após o descongelamento, o que pode ser

considerado um ponto positivo, pois células mais ativas podem exercer suas funções terapêuticas de forma mais rápida e efetiva.

Um estudo recente mostrou aumento na expressão de genes que favorecem a manutenção celular e a pluripotência após o congelamento de CTM derivada de tecido adiposo, mesmo com significativa redução de células viáveis após criopreservação (Davies et al., 2014). Esses pesquisadores acreditam que a criopreservação pode ter realizado um processo de seleção positiva, ou seja, as células que permaneceram viáveis após descongelamento são mais resistentes e funcionais. Acredita-se que esse mesmo processo pode ter ocorrido no presente estudo.

Considerando que após a criopreservação as CTM mantiveram seu fenótipo, o potencial de diferenciação, a viabilidade e atividade mitocondrial, a utilização de CTM de banco de células congeladas é uma opção viável no tratamento do trauma de medula espinhal. Essa hipótese foi confirmada, pois ativou células da micróglia/macrófagos com fenótipo anti-inflamatório e aumentou a quantidade de neurônios íntegros a administração intravenosa dessas células reduziu o infiltrado inflamatório. Além disso, as CTM diminuíram a degeneração da substância branca e a ativação de astrócitos. O tratamento com CTM criopreservadas estimulou a expressão de IL-10, reduziu o TNF α e TGF- β e aumentou a expressão dos fatores neurotróficos GDNF e VEGF.

O aumento da expressão de IL-10 observado no grupo tratado com CTM pode ter ocorrido devido a produção desta citocina pelas CTM. Estudos *in vitro* mostraram que as CTM são capazes de produzir IL-10 (Nakano et al., 2010; Zhukareva et al., 2010). Portanto, apesar de não se ter comprovado a produção dessa citocina pelas CTM *in vivo*, essas podem ter sido as responsáveis pelo aumento na expressão relativa de IL-10 24 horas após o trauma medular.

Diversas pesquisas avaliaram os efeitos benéficos da IL-10 no trauma de medula espinhal experimental, seja por meio da sua administração direta, ou pelo uso de outras terapias que induzem o aumento da sua concentração (Bethea et al., 1999; Brewer et al., 1999; Jackson et al., 2005; Zhou et al., 2009). No trabalho de Bethea et al. (1999) comparou-se a administração de IL-10 30 minutos ou três dias após a lesão e somente a administração após 30 minutos reduziu o infiltrado inflamatório, a expressão de TNF α , a ativação de astrócitos e promoveu recuperação funcional. Brewer et al. (1999) também avaliaram a administração de IL-10 30 minutos após injúria de medula espinhal, e mostraram que ela aumentou a sobrevivência de neurônios submetidos a excitotoxicidade. Além disso, Wirjatijasa et al. (2002) observaram que a IL-10 inibiu a expressão de moléculas de adesão e ativou células da micróglia com fenótipo anti-inflamatório. Nos estudos de Jackson et al. (2005) e Zhou et al. (2009) a administração de vírus transfectados com IL-10 induziu o aumento na expressão dessa citocina 24 horas após trauma. Esse tratamento reduziu a expressão de moléculas de adesão, o infiltrado inflamatório, a apoptose de neurônios e oligodendrócitos estimulando a recuperação da função motora. Todas essas pesquisas mostraram efeitos benéficos da IL-10 no trauma de medula espinhal mas os resultados foram favoráveis apenas quando ocorreu aumento dessa citocina nas primeiras 24 horas após lesão medular (Bethea et al., 1999; Brewer et al., 1999; Jackson et al., 2005; Zhou et al., 2009).

Portanto acredita-se que a IL-10 seja uma das responsáveis pela redução do infiltrado inflamatório e da ativação de astrócitos, bem como pelo aumento da ativação de células da micróglia/macrófagos com fenótipo anti-inflamatório, da sobrevivência neuronal e da recuperação da função motora.

A redução na expressão de TNF α nos tempos de avaliação oito e 21 dias após o trauma medular no grupo tratado com CTM sugere que a reação inflamatória foi menos intensa nesse grupo. O TNF α funciona como um indicador do processo inflamatório e da ativação de células da micróglia/macrófagos e astrócitos (Bethea et al., 1999; Chen et al., 2014). Ele amplifica a resposta inflamatória, induz apoptose de neurônios e de oligodendrócitos e provoca desmielinização, eventos que contribuem para perda de tecido após o trauma de medula espinhal (Lau e Yu, 2001; Wang e Shuaib, 2002; Nakamura et al., 2003; Yune et al, 2013). Observou-se em estudos prévios que existe um primeiro pico na expressão de TNF α oito horas após o trauma seguido pela sua redução gradativa. No sétimo dia, ocorre um segundo pico de TNF α e suas concentrações permanecem altas até 14^o dias após o trauma medular. Esse segundo pico ocorre devido a sua produção por células da micróglia/macrófagos ativadas presentes no local de lesão (Wang et al., 1996; Wang et al., 1997; Lau e Yu, 2001; Nakamura et al., 2003; Yune et al., 2003; Zhukareva et al., 2010. al.; Nishimura et al., 2013; Chen et al., 2014). A diminuição na expressão de TNF α , observada no grupo CTM, oito dias após trauma medular, pode ser explicada pela redução na quantidade de células da micróglia/macrófagos ativadas observada nesse mesmo grupo e tempo de avaliação. Já a redução na expressão de TNF α verificada aos 21 dias no grupo CTM, está provavelmente relacionada à diminuição na ativação de astrócitos, uma vez que nesse tempo de avaliação não houve redução de células da micróglia/macrófagos. Ressalta-se que a redução de TNF α também pode ter diminuído a degeneração de substância branca que foi menos intensa nesse mesmo grupo e tempo de avaliação, pois o TNF α provoca desmielinização (Wang e Shuaib, 2002; Yune et al, 2013).

Nakajima et al. (2012) e Hawryluk et al. (2012) também observaram redução na expressão de TNF α em animais submetidos a trauma de medula espinhal e tratados com células tronco. Entretanto, esses autores não descreveram os mecanismos pelos quais as células tronco reduzem a produção de TNF α . No presente estudo, acredita-se que o aumento da IL-10 no grupo CTM possa ter reduzido o infiltrado inflamatório e por consequência a produção de TNF α .

A ausência de variação na expressão da IL-1 β após o tratamento com CTM, no presente estudo, pode ter sido observada porque grande parte da produção dessa citocina é realizada por astrócitos constituintes da BHE e não pelo infiltrado inflamatório como ocorre com o TNF α (Ledebouer et al. 2000; Lau e Yu et al., 2001). A ruptura da BHE induzida pelo trauma provavelmente estimulou a produção de IL-1 β e as CTM não foram capazes de interferir nesse processo. Outro fator interessante também descrito nos trabalhos Wirjatijasa et al. (2002) e Ledebouer et al. (2000) é que a administração de IL-10 não reduz a produção de IL-1 β após trauma de medula espinhal.

O TGF- β é um fator neurotrófico conhecido por sua ação na reparação de lesões teciduais e sua expressão aumenta nos primeiros dias após o trauma medular (Nakamura et al., 2003; Spitzbarth et al., 2011; Hawryluk et al, 2012). A redução na expressão de TGF- β 24 horas após o trauma, no grupo CTM, indica que essas células reduziram a sua produção. Acredita-se que a IL-10 seja uma das responsáveis por esse efeito uma vez que ela realiza algumas ações contrárias ao TGF- β (Wirjatijasa et al., 2002) e que atingiu as maiores concentrações nesse mesmo grupo e tempo de avaliação. A IL-10 inibe as moléculas de adesão e ativa células da micróglia/macrófagos com fenótipo anti-inflamatório, já o TGF- β aumenta a expressão de moléculas de adesão e ativa células da micróglia/macrófagos com fenótipo pró-inflamatório (Wirjatijasa et al., 2002). Dessa forma o aumento na expressão de TGF- β 24 horas após trauma no grupo CP pode ter sido a causa do maior infiltrado inflamatório observado nesse grupo, que foi constituído predominantemente por células com formato ameboide e citoplasma denso, características de macrófagos pró-inflamatórios.

No tempo de avaliação 21 dias a menor expressão de TGF- β no grupo CTM pode ser atribuída à redução de astrócitos ativados observada nesse grupo e tempo de avaliação, uma vez que os astrócitos são os principais produtores dessa neurotrofina (Wirjatijasa et al., 2002; Kohta et al., 2009). Além disso o TGF- β possui ação autócrina, induzindo a proliferação e ativação de astrócitos que contribui para formar a cicatriz glial, a qual funciona como uma barreira física e impede a regeneração dos axônios (Bethea e Dietrich, 2002; Wang e Shuaib, 2002). Baseado nesses achados Kohta et al., (2009) realizaram um estudo em que o bloqueio da ação do TGF- β favoreceu a recuperação da função motora após o trauma de medula espinhal. De forma semelhante, a redução na expressão de TGF- β observada aos 21 dias, no grupo CTM, pode também ter diminuído a formação da cicatriz glial e estimulado a recuperação da função motora, no presente estudo.

O aumento na produção dos fatores neurotróficos BDNF, GDNF e VEGF tem sido apontado como um dos principais mecanismos de ação pelo qual o transplante de CTM promove bons resultados no trauma de medula espinhal (Novikova et al., 1996; Dolbeare e Houle, 2003; Gu et al., 2010; Nakano et al., 2010; Zhukareva et al., 2010; Hawryluk et al., 2012; Kinhan et al., 2013; Zhou et al., 2013; Lin et al., 2014; Mead et al., 2014), daí a importância de se estudar esses fatores.

No presente estudo a baixa expressão de BDNF observada nos animais submetidos ao trauma, inclusive nos tratados com CTM, indica que essas células não foram capazes de produzir ou estimular a síntese e liberação desse fator neurotrófico. Alguns estudos prévios também não obtiveram aumento de BDNF após administração de CTM para tratamento do trauma de medula espinhal (Caldeira, 2011; Hawryluk et al. 2012; Abdanipour et al., 2014; Mead et al., 2014), enquanto outros obtiveram (Osaka et al., 2010; Kim et al., 2013; Silva, 2013; Zhou et al. 2013; Kingham et al., 2014). Uma explicação para essa divergência pode ser o momento da administração das CTM após o trauma, pois as células modificam seu perfil de secreção de acordo com os estímulos presentes no microambiente em que se encontram. Além disso, existem variações na produção de neurotrofinas entre CTM provenientes de indivíduos e tecidos diferentes (Zhukareva et al., 2010; Abdanipour et al., 2014; Mead et al., 2014).

Por outro lado, o aumento na expressão de GDNF observado nos tempos de avaliação 72 horas e oito dias, no grupo CTM, indica que essas células secretaram ou estimularam as células do parênquima medular a produzirem GDNF. O aumento na expressão dessa neurotrofina provavelmente contribuiu para o maior número de neurônio íntegros, menor degeneração da substância branca e para recuperação da função motora observados nesse mesmo grupo. Estudos já mostraram que o GDNF é capaz de aumentar a sobrevivência neuronal, reduzir a retração de axônios seccionados, estimular o brotamento axonal bem como, de favorecer a recuperação da função motora, após o trauma medular (Dolbeare e Houle, 2003; Hawryluk et al. 2012; Zhang et al., 2013; Abdanipour et al., 2014; Linn et al. 2014).

O VEGF é uma proteína conhecida por estimular a angiogênese e aumentar a permeabilidade vascular. A angiogênese exerce um papel importante no trauma de medula espinhal, pois ela reduz a isquemia e fornece o suprimento sanguíneo necessário para regeneração de axônios e recuperação da função motora (Figley et al., 2014; Li et al., 2014). Entretanto, o trauma medular diminui a expressão de VEGF. Portanto, terapias que aumentem a expressão dessa neurotrofina podem favorecer a recuperação funcional (Hawryluk et al. 2012; Li et al., 2014; Lin et al., 2014; Mead et al., 2014). Porém, se por um lado o VEGF aumenta a perfusão e favorece os processos relacionados a reparação tecidual, do outro ele pode agravar a hemorragia, o edema e o infiltrado inflamatório. Essas alterações são mais frequentes com o aumento de VEGF na fase aguda,

quando ainda existe ruptura da BHE (An et al., 2010; Shinozaki et al., 2014). O aumento na expressão de VEGF observado aos 21 dias após trauma no grupo CTM sugere que essas células produziram VEGF ou estimularam neurônios, astrócitos ou células da micróglia a fazê-lo. Ressalta-se que o aumento do VEGF ocorreu apenas na fase crônica do trauma medular ou seja, no período em que iniciam-se os processos de reparação tecidual. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva (2013) e Li et al. (2014), que após a administração de células tronco, obtiveram aumento na concentração de VEGF somente na fase crônica do trauma de medula espinhal. No trabalho de Li et al. (2014) mostrou-se que esse aumento estimulou a angiogênese e a recuperação da função motora.

Estudos recentes mostraram que o VEGF também possui ação neuroprotetora e neurotrófica direta. Ele aumenta a sobrevivência dos neurônios e estimula o brotamento axonal (Figley et al., 2014; Mead et al., 2014; Shinozaki et al., 2014). No presente estudo o aumento na expressão de VEGF 21 dias após o trauma medular no grupo que recebeu CTM também foi associado à maior quantidade de neurônios íntegros, menor degeneração da substância branca e a estímulo na recuperação da função motora.

Inúmeras são as pesquisas que obtiveram recuperação funcional após o tratamento do trauma de medular com CTM, nelas foram encontrados alguns resultados que podem justificar tal recuperação como: redução do infiltrado inflamatório, da apoptose de neurônios, aumento na quantidade de tecido preservado e do brotamento axonal (Dasari et al. 2007; Ide et al., 2010; Osaka et al., 2010; Caldeira, 2011; Carvalho, 2011; Nakajima et al., 2012; Kim et al., 2013; Shin e tal., 2013; Zhou et al., 2013; Zhang & He, 2014). Entretanto, os mecanismos de ação das CTM para promover esses resultados não foram completamente elucidados.

No presente estudo, a recuperação funcional observada nos animais do grupo CTM foi associada à redução do infiltrado inflamatório oito dias após o trauma de medula espinhal. Acredita-se que o aumento de IL-10 no tempo de avaliação 24 horas diminuiu a permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão, o que resultou em menor infiltrado inflamatório. Além disso, nesse mesmo tempo de avaliação, houve menor expressão de TGF β que é uma neurotrofina que favorece o infiltrado inflamatório.

Outro fator que pode ter contribuído para a recuperação funcional dos animais tratados com CTM, no presente estudo, foi a predominância de células da micróglia/macrófagos ativadas com morfologia característica de células anti-inflamatória. Estas células apresentam formato arredondado, com citoplasma volumoso, repleto de debris de mielina, sugerindo alta atividade fagocitária (Nakajima et al., 2012; Wirjatijasa et., 2012; Ishii et al., 2013). O aumento da IL-10 e a redução do TGF- β , observados no grupo CTM, podem ter sido os fatores responsáveis pela maior ativação de células da micróglia/macrófagos com características anti-inflamatórias. Estudos prévios já mostraram que a IL-10 ativa células da microglia/macrófagos com fenótipo anti-inflamatório (Ishii et al., 2013) e o TGF- β com fenótipo pró-inflamatório (Wirjatijasa et., 2012).

A redução na ativação de astrócitos observada aos oito e 21 dias, no grupo CTM, também pode ter contribuído para recuperação funcional, pois a cicatriz glial funciona como uma barreira mecânica para a regeneração axonal. Acredita-se que a diminuição na ativação de astrócitos esteja relacionada à redução na expressão de TGF- β , no grupo tratado com CTM.

A redução na marcação de neurônios pelo anticorpo anti-NeuN oito dias após o trauma, no grupo CTM, pode não estar associada a morte neuronal, pois essas células mostraram características de neurônios íntegros na avaliação histopatológica. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido a alguma alteração metabólica que reduziu a expressão de NeuN, mas não resultou na morte desses neurônios. Outro fator que corrobora com essa hipótese é a maior a marcação de neurônios pelo anticorpo anti-NeuN, observado aos 21 dias no grupo tratado com CTM. Unal-Cevik et al. (2004) obtiveram resultado semelhante ao estudar o efeito da isquemia em neurônios de encéfalo. Esses pesquisadores observaram redução na expressão de NeuN sem ocorrência de morte neuronal.

No presente estudo a maior marcação de neurônios pelo anticorpo anti-NeuN observada aos 21 dias após o trauma pode ter ocorrido devido à menor expressão de TNF α e ao aumento de VEGF, observados nesse mesmo grupo e tempo de avaliação. O TNF α é capaz de induzir a morte neuronal por apoptose (Yune et al., 2003), portanto a sua redução contribui para a sobrevivência de neurônios após o trauma. O VEGF possui efeito neuroprotetor favorecendo a sobrevivência de neurônios submetidos a isquemia (Shinozaki et al., 2014), logo ele também pode ter sido responsável pela maior sobrevivência de neurônios aos 21 dias após o trauma medular, no grupo CTM.

A menor intensidade na degeneração da substância branca observada no grupo CTM, 21 dias após trauma de medula espinhal, pode ter ocorrido devido a uma série de fatores. A redução do infiltrado inflamatório observada no grupo CTM pode ter diminuído a liberação de moléculas citotóxicas como proteases, óxido nítrico e espécies reativas derivadas do oxigênio, diminuindo os danos à substância branca. Além disso, houve menor expressão de TNF α , uma citocina causadora de desmielinização (Wang e Shuaib, 2002). Outro fator foi a maior expressão de GDNF, neurotrofina capaz de reduzir a retração de axônios seccionados e estimular o brotamento axonal (Dolbeare e Houle, 2003).

8. CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento pode-se afirmar que:

A aplicação de CTM alógenas derivadas de tecido adiposo criopreservadas, três horas após trauma de medula espinhal, promoveu efeito imunomodulatório e neuroprotetor em ratos com trauma de medula espinhal;

A aplicação de CTM alógenas derivadas de tecido adiposo criopreservadas, três horas após trauma de medula espinhal estimulou a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e dos fatores neurotróficos GDNF e VEGF, em ratos com trauma de medula espinhal;

A aplicação de CTM alógenas derivadas de tecido adiposo criopreservadas, três horas após trauma de medula espinhal reduziu a expressão da citocina pró-inflamatória TNF α e do fator neurotrófico TGF- β , em ratos com trauma de medula espinhal.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que as CTM criopreservadas são uma alternativa promissora para o tratamento do trauma de medula espinhal. No presente estudo não foi possível esclarecer qual a forma de ação das CTM no trauma de medula espinhal. Uma pergunta que ainda precisa ser respondida é se após serem administradas as CTM produzem IL-10, GDNF e VEGF ou se elas estimulam a produção dessas moléculas por outras células constituintes do parênquima medular

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R.; BOELONI, J. N.; et al. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. *BMC Vet Res*, v. 10, p. 190, 2014.

AN, S.S.; JIN, H.L.; KIM, K.N.; et al. Neuroprotective effect of combined hypoxia-induced VEGF and bone marrow-derived mesenchymal stem cell treatment. *Childs Nerv. Syst.*, v.26, p.323-331, 2010.

ANKENY, D.P.; MCTIGUE, D.M.; JAKEMAN, L.B. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.*, v.190, p.17-31, 2004.

BAER, P.C. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vitro. *World J. Stem Cells*, v.6, p.256-265, 2014.

BASSO, M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. *J. Neurotrauma*, v. 13, p. 343-359, 1996

BETHEA, J.R.; DIETRICH, D. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr opin Neurol*, v.15, p.355-360, 2002.

BETHEA, J.R.; NAGASHIMA, H.; ACOSTA, M.C.; et al. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v.16, p.851-863, 1999.

CALDEIRA, F.M.C. células tronco mesenquimais Indiferenciadas no tratamento do trauma medular espinhal de ratos lewis. 2011. 100p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária – UFMG, Belo Horizonte.

CARVALHO, P.H. Avaliação neurológica e histológica de lesão compressiva da medula espinhal de ratos *Wistar*, tratados com células-tronco mesenquimais. 2011. 95p. Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) – UFV, Viçosa.

CHEN, S.H.; OYARZABAL, E.A.; SUNG, Y.F.; et al. Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. *Glia*, v.00, p.1-14, 2014.

- DARIOLLI, R.; BASSANEZE, V.; NAKAMUTA, J.S.; et al. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype, and plasticity after long-term cryopreservation. *Plos One*, v.8, n.7, p.1-9, 2013.
- DASARI, V.R.; SPOMAR, D.G.; CADY, C.; et al. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspa-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. *Neurochem. Res.*, v.32, p.2080-2093, 2007.
- DAVIES, O.G.; SMITH, A.J.; COOPER, R.M.; et al. The effects of cryopreservation on cells isolated from marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology*, v.69, p.342-341, 2014.
- DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potencial clinical uses. *Exp. Hemat.*, v.28, p.875-884, 2000.
- DHANASEKARAN, M.; INDUMATHI, S.; POOJITHA, R.; et al. Plasticity and banking potential of cultured adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank*, v.14, p.303-315, 2013.
- DOLBEARE, D.; HOULE, J.D.; Restriction of axonal retraction and promotion of axonal regeneration by chronically injured neurons after intraspinal treatment with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *J. Neurotrauma*, v.20, p.1251-1261, 2003.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, p. 315-317, 2006.
- FACCHIANO, F.; FERNANDEZ, E.; MANCARELLA, S.; et al. Promotion of regeneration of corticospinal tract axons in rats with recombinant vascular endotelial growth fator alone and combined with adenovirus coding for this fator. *J. Neurosurg.*, v.97, p.161-168, 2002.
- FIGLEY, S.A.; LIU, Y.; KARADIMAS, K.; et al. Delayed administration of a bio-engineered zinc-finger VEGF-A gene therapy is neuroprotective and attenuates allodynia following traumatic spinal cord injury. *Plos one*, v.9, p.1-21, 2014.
- GU, W.; ZHANG, F.; XUE, Q.; et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord. *Neuropathol.*, v.30, p.205-217, 2010.
- HAUSMANN, O.N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal cord*, v.41, p.369-378, 2003.
- HAWRYLUK, G.W.J.; MOTHE, A.; WANG, J.; et al. An In vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev.*, v.21, p. 2222-2238, 2012.
- HWAN, A.Y.; YEOP, B.Y.; GWANG, L.; et al. Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords: Inflammation, apoptosis, and cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.348, p.560-570, 2006.

- IDE, C.; NAKAI, Y.; NAKANO, N.; et al. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. *Brain Res.*, v.1332, p.32-47, 2010.
- INOUE, M.; HONMOU, O.; OKA, S.; et al. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. *Glia*, v.44, p.111-118, 2003.
- ISHII, H.; TANABE, S.; UENO, M.; et al. $\text{inf-}\gamma$ -dependent secretion of IL-10 from Th1 cells and microglial/macrophages contributes to functional recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis.*, v.4, n.7, 2013.
- JACKSON, C.C.; MESSINGER, J.; PEDUZZI, J.D.; et al. Enhanced functional recovery from spinal cord following intrathecal or intramuscular administration of poliovirus replicons encoding IL-10. *Virology*, v.336, p.173-183, 2005.
- KOHTA, M.; KOHMURA, E.; YAMASHITA, T. Inhibition of TGF- β 1 promotes functional recovery after spinal cord injury. *Neurosci Res.*, v.65, p.393-401, 2009.
- KIM, J.W.; HA, K.Y.; MOLON, J.N. et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation for chronic spinal cord injury in rats. *Spine*, v.38, p. E1065-E1074, 2013.
- KINGHAM, P.J.; KOLAR, M.K.; NOVIKOVA, L.N.; et al. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev.*, v.23, p.741-757, 2014.
- LAU, L.T.; YU, A.C. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J. Neurotrauma*, v.18, n.3, p.351-359, 2001.
- LEDEBOER, A.; BREVÉ, J.J.P.; POOLE, S.; et al. Interleukin-10, Interleukin-4, and transforming growth factor- β differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*, v.30, p.134-142, 2000.
- LI, Z.; GUO, G.H.; WANG, C.X.; et al. Influence of neural stem cell transplantation on angiogenesis in rats with spinal cord injury. *Genet mol res.*, v.13, p.6083-6092, 2014.
- LIN, W.; LI, M.; LI, Y.; et al. Bone marrow stromal cells promote neurite outgrowth of spinal motor neurons by means of neurotrophic factors in vitro. *Neurol. Sci.*, v.35, p.449-457, 2014.
- LINDNER, U.; KRAMER, J.; ROHWEDEL, J.; et al. Mesenchymal stem or stromal cells: Toward a better understanding of their biology. *Transfus. Med. Hemother.*, v.37, p.75-83, 2010.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression. Data using real time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta\text{CT})$ method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MARTIN, D., SCHOENEN, J., DELREE, P., et al. Experimental acute traumatic injury of the adult rat spinal cord by a subdural inflatable balloon: methodology, behavioral analysis, and histopathology. *J. Neurosci. Res.* v.32, p.539-550, 1992.

- MEAD, B.; LOGAN, A.; BERRY, M.; et al. Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *Plos one*, v.9, p.1-10, 2014.
- NAKAJIMA, H.; UCHIDA, K.; YAYAMA, T.; et al. Targeted retrograde gene delivery of Brain-derived-neurotrophic factor suppress apoptosis of neuron and oligodendroglia after spinal cord injury in rats. *Spine*, v.35, n.5, p.497-504, 2010.
- NAKAJIMA, H.; UCHIDA, K.; GUERRERO, A.R.; et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v.29, p.1614-1625, 2012.
- NAKAMURA, M.; HOUGHTLING, R.A.; MACARTHUR, L.; et al. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.*, v.184, p.313-325, 2003.
- NAKANO, N.; NAKAI, Y.; SEO, T.B.; et al. Characterization of conditioned medium of cultured bone marrow stromal cells. *Neurosci. Lett.*, v.483, p.57-61, 2010.
- NANDOE TEWARIE, R.D.S.; HURTADO, A.; RITFELD, G.J.; et al. Bone marrow stromal cells elicit tissue sparing after acute but not delayed transplantation into the contused adult rat thoracic spinal cord. *J. Neurotrauma*, v.26, p.2313-2322, 2009.
- NISHIMURA, S.; YASUDA, A.; IWAI, H.; et al. Time-dependent changes in the microenvironment of injured spinal cord affects the therapeutic potential of neural stem cell transplantation for spinal cord injury. *Mol. Brain*, v.6, n.3, 2013.
- NOVIKOVA, L.; NOVIKOV, L.; KELLERTH, J.O. Brain derived neurotrophic factor reduces necrotic zone and supports neuronal survival after spinal cord hemisection in adult rats. *Neurosci. Lett.*, v.220, p.203-206, 1996.
- OLBY, N. The Pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, v.40, p.791-807, 2010.
- OSAKA, M.; HONMOU, O.; MURAKAMI, T.; et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res.*, v. 1343, p.226-235, 2010.
- PITTENGER, M.F; MACKAY, A.M; BECK, S.C., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, p.143-147, 1999.
- POPOVICH, P.G.; WEI, P.; STOKES, B.T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol.*, v.377, p.443-464, 1997.
- POUNTOS, I.; CORSCADDEN, D.; EMERY, P.; et al. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application, *Injury*, v.38, p.S23-S33, 2007.

SEKHON, L.H.S.; FEHLINGS, M.G. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, v.26, p.s2-s12, 2001.

SCHAFFLER, A.; BUCHLER, C. Concise Review: Adipose tissue-derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem cells*, v.25, p.818-827, 2007.

SHIN, D.A.; KIM, J.M.; KIM, H.I.; et al. Comparison of functional and histological outcomes after intralaminar, intracisternal, and intravenous transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Acta Neurochir.*, v.155, p.1943-1950, 2013.

SHINOZAKI, M.; NAKAMURA, M.; KONOMI, T.; et al. Distinct roles of endogenous vascular endothelial factor receptor 1 and 2 in neural protection after spinal cord injury. *Neurosci Res.*, v.78, p.55-64, 2014.

SILVA C.M.O. Condroitinase ABC associada a células mesenquimais no tratamento do trauma agudo medular em ratos. 2013. 81p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária – UFMG, Belo Horizonte.

SPITZBARTH, I.; BOCK, P.; HAIST, V.; et al. Prominent microglial activation in the early proinflammatory immune response in naturally occurring canine spinal cord injury. *J. Neuropathol Exp Neurol*, v.70, p.713-714, 2011.

THOMPSON, C.D.; ZURKOJ.C.; HANNA,B.F. The therapeutic role of interleukin-10 after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v.30, p.1311-1324, 2013.

VANICKÝ, I.; URDZÍKOVÁ, L.; SAGANOVÁ, K.; et al. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J. Neurotrauma*, c.18, n.12, 2001.

WANG, C.X.; NUTTIN, B.; HEREMANS,H; et al Production of tumor necrosis factor in spinal cord following traumatic injury in rats. *J. Neuroimmunol.*, v.69, p.151-156, 1996.

WANG, C.X.; OLSCHOWKA, J.A.; WRATHALL, J.R. Increase of interleukin-1 β mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. *Brain Res.*, v.759, p.190-196, 1997.

WANG, C.X.; SHUAIB, A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog. Neurobiol.*, v.67, 161-172, 2002.

WIDENFALK, J.; LIPSON, A.; JUBRAN, C.H.; et al. Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury. *Neuroscience*, v.120, p.951-960, 2003.

WIRJATIJASA, F.; DEGHANI, F.; BLAHETA, R.A.; et al. Interleukin-4, Interleukin-10, and Interleukin-1-receptor antagonist but not Transforming Growth Factor – β induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.*, v.68, p.579-587, 2002.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F. et al. Statistical analysis of real-time PCR data. *B. M. C. Bioinformatics*, v. 7, n.7, 2006.

YUNE, T.Y.; CHANG, M.J; KIM, S.J.; et al. Increased production of tumor necrosis factor- α induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma*, v.20, p.207-219, 2003.

ZHANG, D.; HE, X. A meta-analysis of the motion function through the therapy of spinal cord injury with intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats. *Plos one*, v.9, n.4, 2014.

ZHANG, Y.; GU, Z.; QIU, G.; et al. Combination of chondroitinase ABC, Glial cell-derived neurotrophic factor and Nogo A antibody delayed-release microspheres promotes the functional recovery os spinal cord injury. *J Craniofac Surg.*, v.24, p. 2153-2157, 2013

ZHOU, Z.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; et al. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytotherapy*, v.15, p.434-448, 2013.

ZHOU Z.; PENG, X.; INSOLERA, R.; et al. IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp. Neurol*, v.220, p.183-190, 2009.

ZHUKAREVA, V.; OBROCKA, M.; HOULE, J.D.; ET AL. Secretion profile of human bone marrow cells: Donor variability and response to inflammatory stimuli. *Cytokine*, v.50, p.317-321, 2010.

11. ANEXO – Protocolo do CETEA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA nº 41/2012, relativo ao projeto intitulado "*Efeitos parácrino e imunomodulatório do transplante alogênico de células-tronco mesenquimais da medula óssea no tratamento da lesão espínhal*", que tem como responsável(is) **Eliane Gonçalves de Melo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de **11/04/2012**.

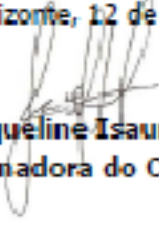
Este certificado expira-se em **11/04/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol CEUA nº 41/2012, related to the project entitled "*Paracrine and immunomodulatory effects of allogeneic mesenchymal stem cells from bone marrow in the treatment of acute spinal injury in rats*", under the supervisors of **Eliane Gonçalves de Melo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **April 11, 2012**.

This certificate expires in **April 11, 2017**.

Belo Horizonte, 12 de Abril de 2012.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 8827 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2006
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3488-4518