

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
INDIFERENCIADAS NO TRATAMENTO DO
TRAUMA MEDULAR ESPINAL DE RATOS LEWIS**

FÁTIMA MARIA CAETANO CALDEIRA

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2011

FÁTIMA MARIA CAETANO CALDEIRA

**Células Tronco Mesenquimais Indiferenciadas no Tratamento do Trauma
Medular Espinal de Ratos Lewis**

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

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo

Co-orientadores: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Prof. Dr. André Ricardo Massensini

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2011

Caldeira, Fátima Maria Caetano, 1973-
C146c Células tronco mesenquimais indiferenciadas no tratamento do trauma medular espinal de ratos Lewis / Fátima Maria Caetano Caldeira. – 2011. 100p. : il.
Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo
Co-orientadores: Rogéria Serakides, André Ricardo Massensini
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia
1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Células tronco – Teses. 3. Traumatismos da medula espinhal – Teses. I. Melo, Eliane Gonçalves de. II. Serakides, Rogéria. III. Massensini, André Ricardo. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. V. Título.

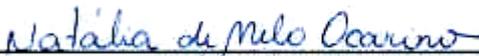
CDD – 636.088 5

Tese defendida e aprovada em 25 de Março de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof.^a Eliane Gonçalves de Melo
Orientadora


Prof.^a Mônica Vicky Bahr Arias


Prof. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira


Prof.^a Natália de Melo Ocarino


Prof.^a Milene Alvarenga Rachid

LISTA DE ABREVIACÕES

BBB: Basso, Beatie, Bresnahan
BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo
cDNA: fita complementar de DNA
CETEA: Comitê de Ética e Experimentação Animal
CN: controle negativo
Ct: ciclo de threshold
CTA: células tronco adultas
CTM: células tronco mesenquimais
DAB: diaminobenzidina peroxidase
eGFP: proteína fluorescente verde
EV: Escola de Veterinária
FACScan: Fluorescence Activated Cell Analyser
GCT: inoculados com CTM
GDNF: fator neurotrófico derivado da glia
GFAP: proteína ácida fibrilar glial
HE: hematoxilina-eosina
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
ME: medula espinal
MP: membro(s) pélvico(s)
MT: membro(s) torácico(s)
NGF: fator de crescimento do nervo
NT-3: neurotrofina - 3
NT-4: neurotrofina 4/5
p75^{NTR}: pan neurotrofina 75
PBS: tampão fosfato salina
PCR: reação em cadeia polimerase
PLA: Inoculados com veículo
PP: posicionamento proprioceptivo
PT: posicionamento tátil

RT-PCR: transcriptase reversa – reação da polimerase em cadeia

Shc: adaptadora semelhante ao colágeno

SNC: sistema nervoso central

TCE: trato corticoespinal

TGF β 1 e β 2: fatores de crescimento tumorais β 1 e β 2

TME: trauma da medula espinhal

TNF: fator de necrose tumoral

TrK: tirosina cinase

TrKB: tirosina cinase B

TrKC: tirosina cinase C

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase – TdT dUTP nick end labeling

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

Fernando Pessoa

Dedico este trabalho a minha família.

Ao meu querido marido, *José Wilacildo de Matos*,
pelo intenso amor,
pelos maravilhosos momentos que passamos juntos e
por me motivar persistentemente à realização dos meus sonhos.

Aos meus queridos pais, *Ricardo e Maria Irene*,
meus verdadeiros heróis, muito obrigada pelo amor incondicional,
carinho e por todos os ensinamentos.

Aos meus irmãos, *Ana Paula, Luis Filipe e Ricardo*,
pelo amor e por todo apoio.

Aos meus queridos sobrinhos, *Lucas, Letícia, Rafael e Isabella*.

Aos meus queridos sogros, *Pedro e Maria Wilacy*,
pela dedicação e carinho sinceros, meu muito obrigada.

Aos meus cunhados, *Pedro, Walecildo, Socorrinho, Kelly, José Antônio, Clarissa e Mariângela*, pelo carinho e apoio, mesmo com a minha ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, pelo sopro da vida, essencial para seguir a diante, modificando a natureza daquilo que nos cerca, mesmo que de uma forma absolutamente singela.

À minha orientadora Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo, pela grande amizade, apoio, motivação, críticas e sugestões, essências à execução desta pesquisa e de jornadas futuras, ainda maiores.

À minha amiga Fabíola Bono Fukushima, pelo carinho, dedicação, apoio e principalmente pela amizade verdadeira, meu muito obrigada.

À Valquíria Alves Smith Lima, pelo companheirismo, com quem pude passar por dias alegres, repletos do verdadeiro sentido da vida, a amizade.

À Jankerle Neves Boleoni, pela amizade e total dedicação, meu muito obrigada.

Aos amigos Bruno Lapertosa Drummond, Paula Mayer Costa, Mário Sergio de Lima Lavor, Carla Maria Osório Silva e Isabel Rodrigues Rosado, pelo companheirismo e apoio emocional.

À minha tia Laurinda e a minha prima Fabíola, por todo carinho e incentivo.

Ao Prof. Álvaro Enéas Falcão, pela amizade e pelos projetos criativos, incluindo o desenvolvimento do aparelho estereotáxico, essencial à realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Rogéria Serakides, pelas relevantes sugestões e críticas durante a execução desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alfredo Miranda Góes e a todos que compõem a sua equipe de pesquisa, pelo carinho, apoio e total disponibilidade, sem os quais seria difícil desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes, pela gentileza e pelas contínuas contribuições em todos os momentos desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Roberto Baracat de Araújo, pela gentileza e atenção em todos os momentos.

Aos outros professores da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente à Dra. Cleuza Maria Faria Resende, Dra. Christina Malm, Dra. Natália de Melo Ocarino, Dr. Renato Lima Santos, Dra. Tatiane Paixão, Dr. Humberto Pereira de Oliveira e Dr. Geraldo Eleno Silveira Alves, com os quais pude conviver e aprender muitos ensinamentos, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Maurício Gino, pela amizade e pelo apoio.

Aos colegas Anna Luiza Facchetti Vinhaes Assumpção, Samanta Laporte, Guilherme Rezende Motta e Nathália, pelos cuidados destinados aos animais desta pesquisa.

Aos colegas da equipe de Neurologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, Bruno Benetti Junta Torres, Karen Maciel de Oliveira e Bernardo de Caro Martins, pela convivência.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, particularmente, Júneo Freitas, Érica, Sílvia, Teane, Juliana, Ana Patrícia, Luciana e Adriana, pela amizade, disponibilidade e apoio contínuos.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Massensini, pelas contribuições na pré-defesa.

À farmacêutica, Nancy, pela competência na obtenção das imagens no microscópio de imunofluorescência.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente ao Carlos, Ronaldo, Elizete, Joaquim, Terezinha, Mardelene e ao Fábio, pela convivência agradável e pela cooperação.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, pela excelente formação.

Aos animais, especialmente, a cadelinha Judi, pelo amor incondicional.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À empresa Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, pela disponibilização dos fármacos empregados nesta pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	20
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1. Processos inflamatório e degenerativo decorrentes do trauma medular.....	24
3.2. Células tronco no tratamento do trauma medular.....	26
3.2.1. <i>Células tronco adultas</i>	27
3.3. Fatores neurotróficos.....	29
3.4. Avaliação comportamental.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea.....	37
4.2. Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais por citometria de fluxo.....	37
4.3. Animais.....	38
4.4. Grupos experimentais.....	38
4.5. Protocolos anestésico e cirúrgico.....	39
4.6. Preparação das CTM para o transplante celular.....	40
4.7. Inoculação de veículo ou de CTM.....	41
4.8. Avaliação neurológica.....	42
4.9. Avaliação microscópica da medula espinal.....	46
4.9.1. Avaliações imunoistoquímicas.....	46
a) Identificação de neurônios.....	46
b) Identificação por imunofluorescência da proteína fluorescente verde (eGFP), da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e da sinaptofisina.....	47
4.9.2. Identificação de células em apoptose pela técnica do TUNEL (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase – TdT dUTP nick end labeling</i>).....	48

4.10.	RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores neurotróficos BDNF e NT-3 e, dos fatores associados a apoptose Bcl-x _l , Bax e caspase-9.....	49
	a) Comparação entre grupos experimentais e delineamento dos primers.....	49
	b) Isolamento do RNA.....	50
	c) Síntese do cDNA.....	51
	d) Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	51
4.11.	Análise estatística.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1.	Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea.....	53
5.2.	Procedimentos cirúrgicos.....	54
5.3.	Avaliações comportamentais.....	55
5.4.	Avaliação microscópica da medula espinal.....	60
	a) Imunoistoquímica com o anticorpo anti-NeuN.....	64
	b) Imunofluorescência com os anticorpos anti-eGFP, anti-GFAP e anti-sinaptofisina.....	67
5.5.	Mensuração por PCR em tempo real da expressão dos mRNAs das neurotrofinas BDNF e Neurotrofina – 3.....	74
5.6.	Identificação de células em apoptose pela técnica do TUNEL (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase – TdT dUTP nick end labeling</i>).....	77
5.7.	Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs do Bcl-x _L , Bax e caspase–9.....	79
6.	CONCLUSÕES	87
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Protocolo do teste BBB (Basso, Beatie e Bresnahan) para avaliação do desempenho locomotor, com os respectivos escores.....	43
Tabela 2.	Protocolo de avaliação neurológica com os respectivos escores para capacidade motora, posicionamento proprioceptivo, posicionamento tátil, permanência em plano inclinado e sensibilidade dolorosa.....	45
Tabela 3.	Genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.....	50
Tabela 4.	Teste de Basso, Beatie e Bresnahan com as medianas de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - <i>CN</i>) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (<i>PLA</i>) ou inoculados com células tronco mesenquimais (<i>GCT</i>), avaliados durante 45 dias.....	56
Tabela 5.	Teste da capacidade motora com as medianas de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - <i>CN</i>) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (<i>PLA</i>) ou os inoculados com células tronco mesenquimais (<i>GCT</i>), avaliados durante 45 dias.....	57
Tabela 6.	Teste do posicionamento proprioceptivo com as medianas de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - <i>CN</i>) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (<i>PLA</i>) ou os inoculados com células tronco mesenquimais (<i>GCT</i>), avaliados durante 45 dias.....	58
Tabela 7.	Teste do plano inclinado com as medianas de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - <i>CN</i>) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (<i>PLA</i>) ou os inoculados com células tronco mesenquimais (<i>GCT</i>), avaliados durante 45 dias.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A) Fotografia do aparelho estereotáxico para ocasionar trauma medular, desenvolvido na EV/UFGM. B) Procedimento cirúrgico do trauma medular experimental em ratos Lewis, momento da lesão medular do tipo contusiva/compressiva, utilizando-se o modelo de haste associado a peso de 70g.....	40
-----------	---	----

Figura 2.	Fotografias do segundo procedimento cirúrgico (14° dia pós-trauma), momento em que se inoculou o veículo (PBS) ou as células tronco mesenquimais (CTM) na medula espinal de ratos Lewis submetidos a trauma medular. A) Verificar a microbomba de infusão conectada a uma seringa de Hamilton de 10µL. B) Observar a agulha 30G posicionada na medula espinal, local da laminectomia e do trauma medular (seta branca).....	42
Figura 3.	Fotomicrografia de células tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea de ratos, cultivadas em garrafa T75cm ² contendo DMEM e 10% de soro fetal bovino. Notar a característica morfológica das células (Barra = 50µm).....	53
Figura 4.	Histogramas da citometria de fluxo com o padrão de expressão das moléculas de superfície presentes em células tronco mesenquimais da medula óssea de ratos. Estas células apresentaram imunomarcagem de 2,45% para o antígeno CD45, 82,27% para o CD54 e 87,89% para o CD90(M1: corresponde à imunomarcagem positiva das células acima de 10 ¹).....	54
Figura 5.	Gráfico do teste de posicionamento tátil, mostrando os escores (medianas) de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - CN) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (PLA) ou os inoculados com células tronco mesenquimais (GCT), avaliados durante 45 dias. (Dias 0° = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; 1° = 24 horas após o procedimento cirúrgico; 14° = inoculação de veículo ou de CTM; 15° = 24 horas após o segundo procedimento cirúrgico).....	58
Figura 6.	Fotomicrografias de secções transversais da medula espinal de ratos Lewis coradas em H.E, na 5ª semana pós-inoculação. Figuras 6A-D-G-J) Medula espinal de um animal do grupo controle negativo - CN. A) Verificar a morfologia normal, com as substâncias cinzenta e branca. D) Verificar o formato em „H“ da substância cinzenta. G) Observar a proporção dos constituintes celulares no corno dorsal da substância cinzenta. J) Observar os neurônios (cabeça de seta) e células da glia (seta preta). Figuras 6B-E-H-L) Medula espinal de um animal do grupo inoculado com veículo - PLA. B) Observar a perda da arquitetura normal e a extensão da área de mielomalácia (área circundada com tracejado azul). E) Observar a mielomalácia. H) Verificar a proliferação de células. L) Observar a presença de células da glia e de Gitter (seta azul). Figuras 6C-F-I-M) Medula espinal de um animal pertencente ao grupo inoculado com células tronco mesenquimais - GCT. C) Observar a perda da arquitetura normal e a extensão da mielomalácia (área circundada com tracejado preto). F) Observar a mielomalácia. I) Observar a proliferação de células. M) Verificar a presença de células da glia e de Gitter (seta azul) (Figuras 6A-B-C: barra = 500µm; figuras 6D-E-F: barra = 200µm; figuras 6G,H,I: barra = 100µm; figuras 6J-L-M: barra = 50µm).....	63

Figura 7. Fotomicrografias de secções transversais da medula espinal de ratos Lewis, na região do epicentro da laminectomia e submetidas à imunoistoquímica com anti-NeuN, na 5ª semana pós-inoculação. Figuras 7A-D-G) Medula espinal de um animal do grupo controle negativo – *CN*. A) Observar a imunomarcagem de corpos neuronais (NeuN-positivos) distribuídos por toda substância cinzenta. D) Marcação de corpos neuronais (NeuN-positivos) no corno dorsal da substância cinzenta. G) Observar a presença de numerosos corpos neuronais (NeuN-positivos). Figuras 7B–E-H) Medula espinal de um animal do grupo inoculado com veículo – *PLA*. B) Observar a perda da arquitetura normal e a escassez da imunomarcagem de neurônios. E-H) Observar a reduzida imunomarcagem de corpos neuronais (NeuN-positivos) no corno dorsal da substância cinzenta (tracejado azul), confirmada pela análise quantitativa representada nos gráficos 7J-L. Figuras 7C-F-I) Medula espinal de um animal do grupo inoculado com células tronco mesenquimais – *GCT*. C) Observar a perda da arquitetura normal e a escassez da imunomarcagem de neurônios. F-I) Observar a reduzida imunomarcagem de corpos neuronais (NeuN-positivos) no corno dorsal da substância cinzenta (tracejado preto), confirmada pela análise quantitativa representada nos gráficos 7J-L. J) Gráfico das médias e dos desvios-padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos/campo, presentes na região do epicentro da laminectomia de de ratos Lewis, na 5ª semana pós-inoculação. J) Gráfico das médias e dos desvios-padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos/campo, presentes nas regiões adjacentes a laminectomia de ratos Lewis, na 5ª semana pós-inoculação (controle negativo – *CN*, inoculados com veículo - *PLA* e inoculados com células tronco mesenquimais - *GCT*). Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). (Figuras 7A-B-C: barra = 500µm; figuras 7D-E-F: barra = 200µm; figuras 7G,H,I: barra = 100µm)..... 65

Figura 8. Fotomicrografia de secção transversal da medula espinal de ratos Lewis, na região do epicentro do trauma e submetidas à imunoistoquímica com anti-eGFP, na 5ª semana pós-inoculação das CTM. Observar a imunomarcagem de células tronco mesenquimais transgênicas para a proteína fluorescente verde (eGFP) (em vermelho) e imunomarcagem de núcleos de outras células (em azul pelo DAPI), localizados na substância branca de um animal do grupo inoculado com células tronco mesenquimais (*GCT*). (200x)..... 67

Figura 9. Fotomicrografias de secções transversais da medula espinal de ratos Lewis, submetidas à imunofluorescência com anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP), na 5ª semana pós-inoculação. A) Imunomarcagem anti-GFAP (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI), no funículo dorsal da substância branca, animal pertencente ao grupo controle negativo (*CN*). B) Imunomarcagem anti-GFAP (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI), no funículo dorsal da substância branca, animal submetido a trauma medular e inoculado com veículo (*PLA*). Observar a maior intensidade da imunomarcagem, em relação ao *CN*. C) Imunomarcagem anti-GFAP (em vermelho) e núcleos de células (em azul

pelo DAPI), no funículo dorsal da substância branca, animal submetido a trauma medular e inoculado com células tronco mesenquimais (*GCT*). Observar a maior intensidade da imunomarcagem em vermelho, em relação ao *CN*, confirmada pela análise quantitativa representada no gráfico D. D) Análise quantitativa da porcentagem da densidade integrada de pixels na área da fração para a GFAP na substância branca, valores expressos em médias e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). (200x).....

70

Figura 10. Fotomicrografias de secções transversais da medula espinal de ratos Lewis, submetidas à imunofluorescência com anti-sinaptofisina, na 5ª semana pós-inoculação (correspondente ao 49º dia após a primeira cirurgia). A) Imunomarcagem anti-sinaptofisina (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI) no funículo dorsal da substância branca, animal pertencente ao grupo controle negativo (*CN*). B) Imunomarcagem anti-sinaptofisina (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI) presente no funículo dorsal da substância branca, animal submetido a trauma medular e inoculado com veículo (*PLA*). Observar a menor intensidade da imunomarcagem, em relação ao *CN*. C) Imunomarcagem anti-sinaptofisina (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI) presente no funículo dorsal da substância branca, animal submetido a trauma medular e inoculado com células tronco mesenquimais (*GCT*). Observar a menor intensidade da imunomarcagem, em relação ao *CN*, confirmada pela análise quantitativa representada no gráfico D. D) Análise quantitativa da porcentagem da densidade integrada de pixels na área da fração presente para a sinaptofisina na substância cinzenta, valores expressos em média e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa (***) = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$). (200x).....

73

Figura 11. Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e da neurotrofina – 3 (NT-3) (normalizada em relação ao gene constitutivo B-actina) no segmento medular de ratos Lewis submetidos à laminectomia (*CN*, $n = 4$) ou ao trauma medular (inoculados com veículo - *PLA*, $n = 4$; inoculados com células tronco mesenquimais – *GCT*, $n = 4$). A) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do BDNF, realizada na 2ª semana pós-inoculação. B) Quantificação absoluta da expressão do mRNA da NT-3, realizada na 2ª semana pós-inoculação. C) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do BDNF, realizada na 3ª semana pós-inoculação. D) Quantificação absoluta da expressão do mRNA da NT-3, realizada na 3ª semana pós-inoculação. E) Quantificação relativa da expressão do mRNA do BDNF, realizada na 5ª semana pós-inoculação. F) Quantificação relativa da expressão do mRNA da NT-3, realizada na 5ª semana pós-inoculação. Valores expressos em médias e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$).....

76

Figura 12. Gráfico das médias e desvios-padrão do número de corpos apoptóticos presentes na medula espinal de ratos Lewis, na região da laminectomia (controle negativo - *CN*) ou do trauma medular (inoculados com veículo -

PLA ou inoculados com células tronco mesenquimais - *GCT*) e, submetidas à técnica do TUNEL, na 5ª semana pós-inoculação. Asterisco indica diferença significativa (** = $p < 0,001$; * = $p < 0,003$)..... 78

Figura 13. Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs do Bcl- x_L e do Bax (normalizada em relação ao gene constitutivo B-actina) no segmento medular de ratos Lewis submetidos à laminectomia (*CN*, $n = 4$) ou ao trauma medular (inoculados com veículo - *PLA*, $n = 4$; inoculados com células tronco mesenquimais - *GCT*, $n = 4$). A) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do Bcl- x_L , realizada na 2ª semana pós-inoculação. B) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do Bax, realizada na 2ª semana pós-inoculação. C) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do Bcl- x_L , realizada na 3ª semana pós-inoculação. D) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do Bax, realizada na 3ª semana pós-inoculação. E) Quantificação relativa da expressão do mRNA do Bcl- x_L , realizada na 5ª semana pós-inoculação. F) Quantificação relativa da expressão do mRNA do Bax, realizada na 5ª semana pós-inoculação. Valores expressos em médias e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa (** = $p < 0,003$; * = $p < 0,05$)..... 82

Figura 14. Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão do mRNA da caspase-9 (normalizada em relação ao gene constitutivo B-actina) no segmento medular de ratos Lewis submetidos à laminectomia (*CN*, $n = 4$) ou ao trauma medular (inoculados com veículo - *PLA*, $n = 4$; inoculados com células tronco mesenquimais - *GCT*, $n = 4$). A) Quantificação absoluta da expressão do mRNA da caspase-9, realizada na 2ª semana pós-inoculação. B) Quantificação absoluta da expressão do mRNA da caspase-9, realizada na 3ª semana pós-inoculação. C) Quantificação relativa da expressão do mRNA da caspase-9, realizada na 5ª semana pós-inoculação. Valores expressos em médias e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa (** = $p < 0,003$; * = $p < 0,05$)..... 85

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito das células tronco mesenquimais indiferenciadas (CTM), oriundas da medula óssea, no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular (TME). Para tanto, foram isoladas e cultivadas CTM de cinco ratos Lewis transgênicos para a proteína fluorescente verde (eGFP). Paralelamente, foram utilizados 61 ratos machos Lewis adultos distribuídos em três grupos: controle negativo (*CN*) e inoculados com veículo (*PLA*) ou com CTM (*GCT*). Todos os animais foram submetidos à laminectomia de T12, sendo este o único procedimento realizado no *CN*; enquanto que nos demais grupos foi realizado TME com peso de 70g, durante cinco minutos. Após 14 dias, realizou-se exposição deste sítio cirúrgico em todos os animais, sendo que em *PLA* e *GCT* foram administrados, no epicentro da lesão, 2µL de PBS (tampão fosfato salina) e $1,5 \times 10^5$ CTM em 2µL de PBS, respectivamente. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas no tempo. Realizou-se a cada quatro dias, durante 45 dias consecutivos, exame neurológico dos animais baseado no teste de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) e no método adaptado da escala descritiva. Na 2^a, 3^a e 5^a semana pós-inoculação, os ratos foram submetidos à eutanásia para colheita da medula espinal e avaliação da expressão dos genes do BDNF, NT-3, Bcl-x_L, Bax e caspase-9 por RT-PCR em tempo real. Na 5^a semana, a medula espinal também foi avaliada por métodos imunistoquímicos, utilizando-se os anticorpos anti-NeuN, anti-eGFP, anti-GFAP e anti-sinaptofisina, bem como pela técnica de TUNEL para identificação das células em apoptose. Como resultados, verificaram-se, durante todo o período observacional, déficits neurológicos nos animais com trauma, caracterizados por ausência de movimentação a movimentação discreta dos membros posteriores (MPs) que evoluíram para posicionamento plantar da pata sem apoio de peso no MPs. Houve diferença estatística entre as medianas dos grupos *PLA* e *GCT* no 15^o, 16^o, 20^o, 24^o, 32^o e 36^o dia ($p < 0,05$). Em relação aos neurônios identificados pelo anticorpo NeuN, não houve diferença entre os grupos com trauma ($p > 0,05$). Foi maior a intensidade da imunomarcagem da sinaptofisina e menor a formação de corpos apoptóticos no *GCT*, sendo esta variável semelhante ao do grupo *CN* ($p > 0,05$). No grupo *PLA* ocorreu maior expressão de Bax e de caspase-9, respectivamente, na 2^a e 3^a semana pós-inoculação de veículo ($p < 0,05$). De acordo com estes resultados, conclui-se que a administração de $1,5 \times 10^5$ CTM no epicentro da lesão medular, promoveu a preservação da sinaptofisina e interferiu favoravelmente no processo de apoptose, associado a melhora da função motora.

Palavras-chave. Células tronco mesenquimais, trauma medular, sinaptofisina, apoptose, ratos.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of undifferentiated mesenchymal stem cells (MSC), from bone marrow, in the treatment of rats subjected to spinal cord injury (SCI). Thus, MSC from five Lewis rats, transgenic for green fluorescent protein (eGFP), were isolated and cultured. Additionally, sixty-one adult male Lewis rats were randomly distributed in three groups: sham (*CN*), inoculated with placebo (*PLA*) or with MSC (*GCT*). All animals underwent laminectomy of T12, which was the only procedure for *CN*, whereas in the other groups compressive SCI was performed with a 70 g rod for five minutes. After 14 days, the surgical site was exposed in all animals, and for *PLA* and *GCT*, 2 μ L PBS (phosphate buffered saline) and 1.5×10^5 MSC diluted in 2 μ L of PBS were administered at the epicenter of the injury, respectively. The experimental design was completely randomized, with split-plots in time. Neurological examination of animals consisted of Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) test and the descriptive scale adapted method were performed every four days during 45 consecutive days. In the second, third and fifth weeks after inoculation, rats were euthanized, then the spinal cord was collected for evaluation of gene expression of neurotrophic factors (BDNF and NT-3), and apoptosis pathway signalings (Bcl-xL, Bax, and caspase-9) by real time RT-PCR. In the fifth week, the spinal cord was also assessed by immunohistochemical methods, using anti-NeuN, anti-eGFP, anti-GFAP, and anti-synaptophysin antibodies, as well as by TUNEL technique to identify cells undergoing DNA fragmentation. Neurological deficits were observed throughout the evaluation period in the animals with injury, characterized by lack of movement to slight movement of hind limbs (HL), which progressed to plantar paw placement without weight support of the HL. There was statistical difference between the medians of groups *PLA* and *GCT* at Days 15, 16, 20, 24, 32, and 36 ($p < 0.05$). There was no difference on neuron viability between groups with trauma ($p > 0.05$), as identified by NeuN antibody. The intensity of immunostaining for synaptophysin was higher and the formation of apoptotic bodies was lower for *GCT*, and this variable was similar to the normal control group (*CN*) ($p > 0.05$). *PLA* group showed a higher expression of Bax and caspase-9, respectively, in the second and third weeks after vehicle inoculation ($p < 0.05$). Thus, we conclude that the administration of 1.5×10^5 MSC at the epicenter of spinal cord injury preserved synaptophysin and favorably affected the apoptosis process, associated with improvement of motor function.

Key-words. Stem cells, spinal cord injury, synaptophysin, apoptosis, rats.

1. INTRODUÇÃO

A lesão traumática da medula espinal (TME) origina-se da transferência da energia cinética do trauma para o tecido nervoso, podendo com isso ocasionar contusão, compressão e laceração. Com o impacto, ocorre morte imediata de células presentes no sítio da injúria, sendo comum a intensa perda de neurônios e/ou de seus constituintes, como as vesículas sinápticas (Hagg e Oudega, 2006). Posteriormente, é observada uma complexa cascata de eventos, que também contribuem para a progressão do dano tecidual inicial (Ducker et al., 1978; Tator e Rowed, 1979; Lohse et al., 1980; Colter e Rucker, 1988; Shores, 1992).

Dentre as alterações secundárias, a apoptose apresenta papel central e a partir de insultos gerados com o TME, podem ser ativadas as caspases pelas vias bioquímicas intracelulares extrínseca ou intrínseca (mitocondrial). Nesta via, a menor expressão da proteína Bcl-x_L e o aumento de Bax determinam a translocação do citocromo c para o citoplasma e a ativação de uma cascata proteolítica, iniciada pela caspase-9, uma proteína membro da família das cisteínas proteases (Keane et al., 2001). Com isso, a apoptose intensifica a perda celular, sendo detectada em picos na primeira semana após a lesão medular e, acometendo, neste período, principalmente os oligodendrócitos (Li et al., 1996; Lu et al., 2000). O suporte trófico inadequado após o TME destaca-se como um dos principais fatores que contribuem para a apoptose destas células (Barres et al., 1993), incluindo o declínio nas concentrações do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e da neurotrofina 3 (NT-3) (Hajebrahimi et al., 2008). Deste modo, os eventos secundários contribuem para a incapacidade regenerativa da medula espinal e para a manifestação de déficits funcionais permanentes, como a perda variável das

funções sensorial, motora e autonômica (Raineteau e Schwab, 2001).

Com intuito de promover a criação de um ambiente favorável à reparação tecidual, com a reposição de células no local da lesão, têm sido avaliadas as terapias celulares no tratamento do TME (Thuret et al., 2006). Dentre as células utilizadas, estão as células tronco adultas (Hofstetter et al., 2002; Ankeny et al., 2004; Ohta et al., 2004), além das células tronco embrionárias (Brüstle et al., 1999, Hofstetter et al., 2005; Karimi-Abdolrezaee et al., 2006), fibroblastos (Tuszynski et al., 1994; Tobias et al., 2003), células da bainha olfatória (Lu et al., 2006) e células de Schwann (Dunning et al., 2006; Pearse et al., 2007). Em relação às células tronco adultas, existem as mesenquimais (CTM) presentes na medula óssea, que são interessantes pela facilidade de obtenção e de expansão (Fischer, 2000). Além disso, as CTM promoveram a preservação de mielina presente na substância cinzenta (Ankeny et al., 2004), o crescimento axonal orientado (Himes et al., 2006) e a recuperação comportamental, sendo este efeito atribuído à menor expressão de caspase-3, outra proteína também associada a apoptose (Dasari et al., 2007). Devido a estas características, as CTM já foram empregadas no TME, no entanto os mecanismos pelos quais exercem seus efeitos não estão completamente estabelecidos, sendo ainda mais incipientes os estudos sobre a ação destas células nas diferentes vias de apoptose e na preservação de constituintes celulares, como a sinaptofisina. Neste contexto, postulou-se que as CTM administradas tardiamente em ratos com TME pudessem interferir na via mitocondrial da apoptose e/ou pudessem promover maior expressão dos fatores BDNF e NT-3, criando com isso um ambiente favorável para a regeneração neuronal.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos avaliar o efeito das CTM no tratamento de ratos Lewis submetidos ao trauma contusivo/compressivo experimental da medula espinal. Para tanto, foram definidos como objetivos específicos:

- avaliar a recuperação funcional após a injúria medular;
- avaliar a morfologia geral da medula espinal no epicentro do trauma e a viabilidade neuronal, além da preservação da sinaptofisina e a formação da cicatriz glial e,
- avaliar a expressão de neurotrofinas e os efeitos na apoptose.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Processos inflamatório e degenerativo decorrentes do trauma medular

O impacto traumático à ME causa, no local da lesão, morte imediata de neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e de células endoteliais (Hagg e Oudega, 2006). Em seguida, são observados eventos secundários, incluindo a isquemia e o dano tecidual progressivo, ambos diretamente dependentes do tempo pós-trauma (Colter e Rucker, 1988; Shores, 1992).

A isquemia observada ocorre por ação direta do trauma ao leito vascular e pelo vasoespasmos, este subsequente à liberação de aminas simpatomiméticas (Tator e Koyanagi, 1997; Taoka e Okajima, 1998). Independentemente, a hipotensão e a perda da auto-regulação vascular são fatores adicionais que alteram o fluxo sanguíneo intramedular (Balantine, 1978; Wagner et al., 1978; Kakulas, 1984). A hemorragia restringe-se inicialmente a regiões com vascularização intensa como na substância cinzenta e em estágios mais tardios, expande-se para a substância branca periférica, bem como nas direções rostral e caudal à lesão (Hagg e Oudega, 2006). Em função da elevada taxa metabólica requerida, a substância cinzenta, em menos de uma hora do trauma grave, tende a apresentar lesões irreversíveis como a formação de área necrótica hemorrágica (Kakulas, 1984). Já a substância branca suporta período superior de hipoxemia sem, contudo, manifestar danos irreparáveis (Tator e Fehlings, 1991).

Comumente, a lesão medular atinge também a barreira hemato-encefálica que ao se romper, determina ativação de cascata complementar e infiltração intensa de neutrófilos no parênquima neuronal. Outro evento importante é o edema local que ocorre em função desse processo

inflamatório e das alterações vasculares (Schnell et al., 1999; Saville et al., 2004). Além de neutrófilos é observado, tardiamente, influxo de outras células inflamatórias, incluindo linfócitos T e macrófagos (Bareyre e Schwab, 2003). A presença de moléculas não pertencentes ao SNC desencadeia resposta celular orquestrada para envolver o local da lesão medular (Silver e Miller, 2004).

Durante o período isquêmico, são produzidas espécies reativas de oxigênio, cuja ação citotóxica exacerba substancialmente a perda tecidual observada. Castro et al. (2004) propuseram que o intenso infiltrado de neutrófilos não contribuiu para a formação dessas substâncias. Contudo, segundo os autores, outros tipos celulares pertencentes ao sistema imune produziram estes e outros radicais livres, resultando na formação de peróxidos e na lesão às membranas celulares.

Outro mecanismo associado à isquemia e que favorece a progressão da lesão na ME é o aporte inadequado de glicose e de oxigênio ao tecido nervoso. A depleção destes elementos pode levar a apoptose, cuja regulação ocorre por uma cascata proteolítica intracelular, mediada primeiramente por membros da família de cisteínas proteases. Foram demonstradas como vias de sinalização para indução da apoptose, a liberação intracitoplasmática do citocromo c pela mitocôndria e as ativações das pró-caspases 9 e 3, dentre outras (Keane et al., 2001).

Além disso, a gravidade da lesão medular está correlacionada ao aumento da concentração extracelular de aminoácidos excitatórios, particularmente o glutamato (Leonard e Rebecca, 2002; Beattie, 2004). A estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos, como o N-metil-D-aspartato, inicia eventos celulares, induzindo também a morte de neurônios,

próximo à área de lesão (Gaviria et al., 2000). A ativação de receptores pelo glutamato aumenta o influxo neuronal de cálcio, que exerce papel crucial na regulação intracelular de sódio e potássio e na ativação de diversas enzimas fundamentais ao metabolismo e à sobrevivência neuronal (Siesjo, 1988; Arundine e Tymianski, 2003). Dentre as enzimas, a fosfolipase A₂ ativada age nos fosfolípidos das membranas celulares liberando ácido aracdônico, precursor de potentes substâncias vasoativas. Esse ácido graxo é instrumento da peroxidação lipídica e da formação de radicais livres, além de ser o gerador de tromboxano e leucotrienos, o que contribui para perpetuar a lesão inicial (Janssen e Hansebout, 1987; Hall, 1992).

A progressão da lesão secundária, segundo Hagg e Oudega (2006), persiste durante a fase subaguda, podendo continuar por meses a anos na fase crônica. Entre três e sete dias após o trauma contusivo, foi observada resposta angiogênica na ME dos animais (Loy et al., 2002). A barreira hemato-encefálica permanece porosa ao sangue e a componentes séricos por 14 dias pós-trauma, sendo observado o recrutamento de células em áreas de maior lesão da própria barreira e na periferia do trauma, também conhecida como região de penumbra (Silver e Miller, 2004). As células da micróglia, precursores de oligodendrócitos, células meningeais e astrócitos isolam a área acometida, formando uma densa cicatriz ou gliose reativa e, com isso minimizam a extensão da inflamação e da degeneração celular (Yiu e He, 2006).

Os astrócitos reativos apresentam-se hipertrofiados, com aumento da expressão de proteínas estruturais ou de filamentos intermediários, incluindo a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), a vimentina e a nestina, cuja demonstração pode ser

realizada com o emprego de métodos imunohistoquímicos (Casella et al., 2004).

Paralelamente ao recrutamento das células pertencentes à cicatriz, os astrócitos produzem elevada quantidade de moléculas da matriz extracelular. Dentre estas, destacam-se a semaforina (Pasterkamp et al., 2001) efrina B2 (Bundesen et al., 2003), tenascina (Apostolova et al., 2006) e os proteoglicanos. Estes são constituídos por carboidratos do tipo glicosaminoglicanos ligados a uma proteína central, sendo denominados de proteoglicanos sulfato de condroitina, incluindo agrecan, brevican, neurocan, versican e fosfacan (Fitch e Silver, 1997; Jones et al., 2003). Ao serem depositados na região central do trauma, esses proteoglicanos apresentam gradiente inibitório, contribuindo para a falência na regeneração axonal como demonstrado por diferentes modelos experimentais (McGraw et al., 2001; Yiu e He, 2006; Busch e Silver, 2007).

A formação dessa cicatriz glial pode ser induzida pela interação entre citocinas inflamatórias, incluindo interferon gama e fator de crescimento fibroblástico 2, como demonstrado por Yong et al. (1991). Neste estudo, foi evidenciado que ocorreu diminuição da atividade mitótica de linfócitos T ativados mediante a prevenção da atividade do interferon gama, enquanto que a adição dessa citocina recombinante induziu a proliferação de astrócitos. A indução da gliose reativa também foi atribuída à produção de substâncias como os fatores de crescimento tumorais (TGF) β 1 e β 2, bem como de interleucinas 1 e 6 (Giulian e Lachman, 1985; Chiang et al., 1994). Imediatamente após o trauma, Silver e Miller (2004) observaram aumento da expressão de TGF β 1, enquanto que o TGF β 2 elevou-se lentamente próximo de astrócitos, células endoteliais e macrófagos presentes na cicatrização. Interessante foi o resultado de Asher et al. (2000) em que a atenuação experimental de ambos os fatores

tumorais determinou redução da cicatriz glial, embora não tenha ocorrido regeneração axonal extensa.

A presença de astrócitos hipertrofiados ao redor de extremidades axonais não regeneradas pode sugerir que a gliose reativa seja responsável pela incapacidade desses prolongamentos neuronais em se regenerarem (Silver e Miller, 2004). Apesar disso, foi demonstrada a importância da astrogliose na proteção do sistema nervoso central pós-trauma (Faulkner et al., 2004). Estes autores, ao utilizarem técnica de infecção de astrócitos mamíferos por herpesvírus simplex aviário combinada com o tratamento antiviral, produziram depleção dos astrócitos na região periférica ao trauma. Posteriormente à lesão, foi observado agravamento dos déficits motores e progressão das alterações secundárias, com morte de oligodendrócitos e de neurônios. Assim os resultados sugeriram que os astrócitos reativos atuaram na reparação da barreira hemato-encefálica, prevenindo a resposta inflamatória prolongada e a degeneração celular.

A incapacidade de regeneração dos axônios também pode ser atribuída à presença de moléculas presentes no SNC, particularmente na substância branca (McConnell e Berry, 1982). Estes componentes são proteínas presentes nas membranas de oligodendrócitos, que fisiologicamente produzem a bainha de mielina. Posteriormente ao TME, ocorre morte de oligodendrócitos não apenas no local da lesão, mas também em áreas distantes ao epicentro (Emery et al., 1998), comprometendo gravemente o funcionamento de axônios. A perda desse tipo celular ocorre principalmente por apoptose e é o resultado de um suporte trófico inadequado (Barres et al., 1993) e também por ação da micróglia ativada (Emery et al., 1998; Li et al., 2005a).

A desmielinização contribui substancialmente para as consequências funcionais do trauma medular, uma vez que ocorre a produção de moléculas com ação inibitória sobre o crescimento de neuritos. Foram identificadas, inicialmente, três moléculas, incluindo Nogo, glicoproteína associada à mielina e glicoproteína oligodendrócito-mielina (Xie e Zheng, 2008). A inibição destas proteínas foi demonstrada em ratos recém nascidos submetidos à irradiação – gama, para depleção de oligodendrócitos e consequentemente de mielina (Savio e Schwab, 1990). A medula espinal desses animais foi transeccionada duas semanas após o nascimento, sendo observado crescimento de fibras do trato corticoespinal (TCE) apenas naqueles submetidos à irradiação. Em outro estudo, camundongos adultos foram imunizados para produzirem anticorpos policlonais contra os inibidores presentes na mielina. Posteriormente, os animais foram submetidos à hemiseção dorsal da medula espinal na região cervical e apresentaram regeneração do TCE, quando comparados com os do grupo controle não imunizados (Huang et al., 1999).

3.2. Células tronco no tratamento do trauma medular

O tratamento experimental do TME tem sido realizado com células tronco, bem como com células diferenciadas, incluindo fibroblastos (Tuszynski et al., 1994), células da bainha olfatória (Lu et al., 2006) e células de Schwann (Dunning et al., 2006; Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

As células tronco são células indiferenciadas que apresentam a capacidade de se dividirem por períodos prolongados, promovendo auto-renovação. Estas células também originam células diferenciadas de acordo com suas propriedades biológicas e com a sua origem, sendo assim classificadas em

embrionárias ou adultas. De acordo com o potencial de diferenciação, as células tronco podem ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes (Zhang et al., 2006).

3.2.1. Células tronco adultas

As células tronco adultas (CTA) estão presentes em uma ampla variedade de órgãos ou tecidos, incluindo epidermal (Watt, 1997), hepático (Alison e Sarraf, 1998), gastrointestinal (Potten, 1998), neuronal (Gage, 2000), cordão umbilical (Sanberg et al., 2005) e medula óssea (Pittenger et al., 1999). A função fisiológica destas células ainda é objeto de estudo, contudo parecem ser responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos (Zhang et al., 2006).

As CTA podem ser pluripotentes quando são capazes de se diferenciarem em quase todos tecidos, exceto placenta e anexos embrionários. As multipotentes geram menor número de tipos celulares, enquanto que as células tronco unipotentes diferenciam-se em um único tecido (Zhang et al., 2006). Entretanto, foi observada que as células tronco tecido-específicas diferenciam-se não apenas em células do tecido de origem, mas também em outras linhagens, com fenótipos celulares de outros tecidos. Este evento foi definido como plasticidade celular ou transdiferenciação (Minguell et al., 2001).

Células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea

As CTM da medula óssea são células progenitoras multipotentes, que apresentam particular interesse devido à facilidade de isolamento e à capacidade de expansão *in vitro*. Outra característica atrativa destas células, é que após a obtenção podem ser transplantadas no próprio indivíduo doador

sem riscos de rejeição (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008), constituindo assim terapia interessante na regeneração de tecidos e órgãos lesados (Barry e Murphy, 2004). Além das CTM, está presente na medula óssea a população de células tronco hematopoiéticas (Thuret et al., 2006).

A presença de CTM não hematopoiéticas foi primeiramente demonstrada por Friedenstein et al. (1976), que observaram células aderentes fibroblastóides, com multiplicação celular rápida. Estes autores também verificaram que as CTM aderem seletivamente em superfícies plásticas, enquanto que as hematopoiéticas são removidas com as trocas sucessivas do meio de cultura.

Como as CTM da medula óssea não apresentam marcadores celulares específicos, foi determinada a criação de critérios mínimos pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of International Society for Cellular Therapy*, a fim de promover o uso de terminologia padronizada e com isso facilitar o intercâmbio entre pesquisadores da área. Inicialmente, foi sugerido que as células aderentes ao plástico denominadas de células tronco mesenquimais, fossem nomeadas células estromais mesenquimais multipotentes. A terminologia de CTM deve ser empregada apenas para um subgrupo das estromais que apresentarem três critérios mínimos (Horwitz et al., 2005), incluindo a aderência ao plástico, a expressão de moléculas de superfície, como CD54, CD73, CD90 e CD105 pelas CTM cultivadas. Paralelamente, não devem expressar os CD11b ou CD14, CD34, CD45, CD79a ou CD19, bem como devem se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (Dominici et al., 2006). Além da diferenciação nestas células como constatado por Pittenger et al. (1999), foi observado que CTM podem gerar eventualmente mioblastos, incluindo fibras musculares esqueléticas e cardiomiócitos

(Orlic et al., 2001). Outras células também foram obtidas a partir das CTM, incluindo hepatócitos (Petersen et al., 1999) e células neuronais (Sanchez-Ramos et al., 2000).

Hofstetter et al. (2002) cultivaram CTM em meio enriquecido para promover a diferenciação neuronal. Com o emprego de registros eletrofisiológicos, verificaram que estas células não apresentavam potenciais de ação relacionados a canais iônicos voltagem dependentes para sódio ou potássio, característica presente em células neurais. Neste estudo, os autores também transplantaram as CTM em ratos submetidos à injúria medular contusiva. Foi verificada maior sobrevivência dessas células nos animais tratados após sete dias do trauma, se comparados com aqueles que receberam imediatamente após o trauma. No exame histológico cinco semanas pós-lesão, as CTM estavam associadas com astrócitos imaturos distribuídos longitudinalmente no epicentro da lesão. De acordo com os autores, a facilidade de obtenção e expansão das CTM justificam o emprego destas células em protocolos de reparação da ME traumatizada.

Em função do potencial das CTM na reparação da lesão medular, foi realizado transplante dessas células na ME de ratos dois dias após o trauma medular contusivo (Ankeny et al., 2004). Com este tratamento, foi observada melhora clínica aos 56 dias de observação, que se caracterizou por movimentos locomotores espontâneos dos membros pélvicos. As CTM preencheram a cavidade cística no local da lesão e foram relacionadas com a preservação da mielina na substância branca, demonstrando seus efeitos neuroprotetores. A matriz formada pelas células transplantadas também favoreceu o maior crescimento axonal, o que não foi verificado nos indivíduos com TME sem tratamento. Com isso, Ankeny et al. (2004) sugeriram que outros estudos com CTM fossem realizados.

O transplante autólogo constitui segundo Ohta et al. (2004) vantagem na utilização clínica das CTM em pacientes com lesão medular. Nesse estudo, foi avaliado o efeito das CTM infundidas no líquido cerebroespinal de ratos com TME. Pequena quantidade de células no epicentro da lesão foi constatada e apesar disto a cavidade cística era menor nos animais tratados com CTM, se comparados ao grupo controle. A recuperação da função motora foi também melhor naquele grupo. Paralelamente, o líquido cerebroespinal dos animais foi colhido e adicionado ao meio onde eram cultivadas neuroesferas, sendo observada maior aderência destas à placa de cultivo. Com base nos resultados, Ohta et al. (2004) sugeriram que as CTM podem exercer seus efeitos por meio da produção de fatores tróficos ou pelo contato com o tecido medular, reduzindo o tamanho da cavidade cística e promovendo melhora funcional da deambulação.

Em outro estudo, a administração de CTM no líquido cerebroespinal foi avaliada em ratos submetidos à lesão traumática da ME (Bakshi et al., 2006). O período ideal de realização do transplante também foi determinado, sendo administradas células no 4º, 9º, 13º, 20º ou 27º dia pós-lesão. O exame histológico das medulas espinhais revelou que as CTM estavam presentes no epicentro da lesão e que promoveram redução do tamanho da cavidade cística. O transplante realizado até 14 dias do trauma medular apresentou melhor eficácia do que as aplicações mais tardias. De acordo com os autores, a técnica de administração das CTM via punção lombar pode ser utilizada em pacientes, facilitando o seu emprego em estudos clínicos.

Paralelamente, Vaquero et al. (2006) compararam o efeito das CTM administradas por via sistêmica ou por via intralésional, três meses após a lesão medular de ratos. Após o tratamento, os animais foram avaliados por mais um

período de seis meses, sendo verificada recuperação funcional superior nos indivíduos tratados com CTM no local da lesão, em relação aos que receberam células pela via intravenosa. Este resultado foi associado à presença das CTM na medula espinal por um período prolongado, bem como pela possibilidade de diferenciação neuronal das células transplantadas no local do trauma.

A eficiência de CTM humanas administradas por diferentes vias, incluindo a intratecal, lombar e intravenosa em ratos com TME também foi avaliada por Paul et al. (2009). Esses autores verificaram maior número de células no epicentro da lesão medular, quando estas foram administradas no próprio local, contudo sugeriram a via lombar pela facilidade e pela possibilidade de múltiplas aplicações.

A evolução funcional após diferentes intensidades de lesão medular em ratos tratados com CTM de humanos foi acompanhada por Himes et al. (2006). Os autores verificaram que estas células secretaram fatores neurotróficos e citocinas, com potencial terapêutico na sobrevivência celular e no crescimento axonal. Os ratos com trauma moderado transplantados com CTM apresentaram recuperação comportamental significativa, em relação aos do grupo controle. Foi observada, pelo exame imunohistoquímico, presença de numerosos axônios no epicentro da lesão dos animais tratados com CTM. Estas foram localizadas duas semanas após a administração, sendo reduzido o número de células na 11ª semana. Os autores concluíram que as CTM têm potencial na reparação da ME lesionada, contudo a utilização dessa terapia celular deve ser cuidadosamente acompanhada com base também em testes comportamentais.

Os efeitos proporcionados pela terapia com as CTM devem estar relacionados à produção de substâncias tróficas benéficas

para o sistema nervoso, como sugerido por Chen et al. (2008). Em um modelo de isquemia cerebral, CTM foram transplantadas no cérebro de ratos previamente submetidos à oclusão transitória da artéria cerebral. Os achados revelaram implantação significativa das CTM na área cerebral isquêmica, com redução da perda cortical. As células transplantadas expressavam proteínas estruturais associadas aos astrócitos e oligodendrócitos e os animais submetidos a este tratamento apresentaram recuperação dos déficits comportamentais.

Os efeitos terapêuticos das CTM humanas, bem como os mecanismos de ação foram também avaliados em ratos com trauma encefálico (Kim et al., 2009). O transplante foi realizado 24 horas após a lesão, havendo significativa recuperação da função neurológica no grupo tratado com CTM. A análise dos hemisférios cerebrais acometidos revelou, pelo teste de ELISA, aumento na expressão do fator neurotrófico NGF no 2º e 8º dia pós-trauma dos animais tratados com CTM. Em relação ao BDNF e NT-3 houve aumento na expressão inclusive no grupo tratado com placebo, provavelmente devido à lesão encefálica. Contudo, o aumento destes fatores foi maior nos animais que receberam CTM. Paralelamente, os autores mensuraram proteínas associadas a apoptose e verificaram diminuição na produção destas proteínas subsequente ao tratamento com CTM. Kim et al. (2009) sugeriram que a recuperação funcional pôde ter ocorrido em função do tratamento com CTM na fase aguda da injúria, cujo efeito foi aumentar a expressão das neurotrofinas, diminuindo a apoptose neuronal.

3.3. Fatores neurotróficos

Os fatores neurotróficos ou neurotrofinas são fatores de crescimento que controlam geração, diferenciação e manutenção de diversas populações neuronais presentes no

sistema nervoso central e periférico (Lewin e Barde, 1996). Teng e Hempstead (2004) mencionaram a atuação dessas substâncias no crescimento de dendritos e de axônios durante o desenvolvimento. Esses fatores também regulam a sinaptogênese e a liberação de neurotransmissores, apresentando assim importante função nas diferentes formas de plasticidade do SNC no indivíduo adulto (Chao, 2003; Carvalho et al., 2008).

A primeira neurotrofina identificada foi o fator de crescimento do nervo (NGF), sendo posteriormente descobertos o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e as neurotrofinas 3 (NT-3) e 4/5 (NT-4). No SNC, o BDNF e o NT-3 são amplamente expressados em neurônios, enquanto que os demais fatores apresentam-se em menor proporção (Liebl et al., 2001). Outras células, incluindo oligodendrócitos (Byravan et al., 1994), astrócitos (Schwartz e Nishiyama, 1994) e micróglia (Elkabes et al., 1996) também podem produzir as neurotrofinas, com ação semelhante àquela exercida em neurônios. No interior da célula, são sintetizados os precursores dos fatores neurotróficos, a partir da ação de convertases pró-hormônios. Após modificações translacionais, os fatores neurotróficos tornam-se proteínas homodiméricas maduras, sendo finalizadas no meio extracelular pela plasmina ou pelas metaloproteinases da matriz 3 e 7 (Allen e Dawbarn, 2006).

As respostas fisiológicas aos fatores neurotróficos são mediadas pela ativação de duas classes distintas de receptores transmembranas, a tirosina cinase (TrK) e o pan neurotrofina $p75^{NTR}$. Tanto as pró-neurotrofinas quanto as proteínas maduras apresentam interações distintas com estes receptores e conseqüentemente podem ser observados efeitos biológicos diversos em células neuronais e não neuronais (Teng e Hempstead, 2004).

A família do receptor TrK é composta pelos tipos A, B e C, sendo estes dois os mais abundantes no SNC (Dawbarn e Allen, 2003). Os diferentes receptores TrK apresentam 87% de homologia na cinase intracelular, sendo o segmento extracelular também semelhante e dividido em cinco regiões D1 a D5. Os fatores neurotróficos ligam-se nessas regiões com elevada especificidade e com afinidade variável, promovendo a dimerização do receptor mediante sua ativação. A partir disso, desencadeiam a trans-autofosforilação da tirosina presente nessa molécula e a ativação de cascatas sinalizadoras intracelulares. Esse mecanismo ocorre a partir da ligação de duas proteínas ao Trk ativado, incluindo a homóloga *Src* e a adaptadora semelhante ao colágeno (*Shc*). Na sobrevivência neuronal é verificada ligação predominantemente de *Shc* ao receptor. A fosforilação de *Shc* pelo Trk também aumenta a atividade da proteína ativada mitogênica-*Ras* e da cinase reguladora da sinalização extracelular, ambas as proteínas interferem no ciclo celular, no crescimento de neuritos e na plasticidade sináptica (Lonze e Ginty, 2002).

Em contraste com a especificidade dos fatores aos TrK, ligam-se ao $p75^{NTR}$ as diferentes neurotrofinas, bem como seus precursores. O $p75^{NTR}$ apresenta-se como uma simples molécula transmembrana, pertencente à família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF). Semelhante a outras moléculas dessa família, a ligação ao $p75^{NTR}$ pode determinar respostas apoptóticas em células neuronais e não neuronais (Hempstead, 2002). Segundo Majdan e Miller (1999), esse mecanismo de morte celular programada é importante durante o desenvolvimento uma vez que permite orientação adequada da inervação nesse período. Paralelamente, foi proposto por Roux e Barker (2002) que a ação primária do $p75^{NTR}$ é aumentar a afinidade e a especificidade das interações das

neurotrofinas aos receptores TrK, agindo como co-receptor. Para tanto é necessário que ocorra a expressão de ambos receptores em uma mesma célula, acompanhada também da produção de neurotrofinas maduras (Teng e Hempstead, 2004).

Nas lesões traumáticas da ME, a morte celular de oligodendrócitos é mediada pela ativação do p75^{NTR} (Beattie et al., 2002). Liebl et al. (2001) verificaram que a expressão dos receptores TrK A, B e C foi reduzida no 1º dia pós-trauma medular em ratos, sendo preservada apenas no tecido neuronal adjacente e em neurônios supraespinhais. A redução na expressão de TrK pode contribuir, de acordo com estes autores, com a excessiva perda de células associada com a injúria contusiva da medula espinal. Em um estudo desenvolvido por Hajebrahimi et al. (2008), foi avaliada a expressão gênica desse receptor, bem como dos TrK (A, B e C) e das neurotrofinas em ratos submetidos a TME. Ao longo do período experimental, foi verificada regulação expressiva do p75^{NTR} em contraste com aquela verificada para o receptor TrK B. A expressão dos outros receptores tirosina cinase não foi detectada a partir de 6 horas do trauma medular. Em relação às neurotrofinas, houve declínio nesse mesmo período seguido por elevação em concentrações semelhantes ao controle. Segundo estes autores, na ausência dos receptores TrK, as neurotrofinas tendem a se ligar ao p75^{NTR} e com isso podem gerar morte celular por apoptose.

3.4. Avaliação comportamental

Em estudos experimentais com lesão medular, o acompanhamento da evolução neurológica apresenta especial interesse e se baseia principalmente na observação da deambulação (Scheff et al., 2002). Comumente, os métodos de avaliação comportamental permitem comparar o efeito de diferentes protocolos terapêuticos,

a partir do registro dos déficits funcionais pós-trauma, bem como possibilitam associá-los à gravidade, localização e duração da lesão (von Euler et al., 1996).

A observação da deambulação em animais pode ser realizada em esteira, durante seção de natação e em um campo aberto no solo, sendo esta a mais utilizada. No campo aberto, a função locomotora, especialmente dos membros torácicos (MTs) e dos pélvicos (MPs), é observada, sendo com isso possível identificar a integridade dos sistemas sensorial e motor, que servem como substrato para a recuperação após o TME (Sedy et al., 2008).

A avaliação do desempenho do sistema locomotor em campo aberto é simples e facilmente reproduzível, não exigindo aparelhos especiais para a sua execução. A observação de movimentos específicos dos membros foi parâmetro para o desenvolvimento de escalas, como a apresentada no teste de campo aberto de Tarlov (Tarlov, 1954). Este método foi o mais empregado no passado (Sedy et al., 2008) e apresenta classificação em cinco categorias, sendo considerados os movimentos dos MPs e o apoio de peso (Tarlov, 1954). Segundo Broton et al. (1996) e Metz et al. (2000) a sensibilidade do teste de Tarlov é reduzida para animais sem a capacidade de suportar o peso sobre os MPs. Posteriormente, o teste foi adaptado sendo, então, denominado de teste em campo aberto de Tarlov modificado, com escala 0 para paralisia completa e 6 para locomoção normal (Guizar-Sahagun et al., 2004).

Modificações adicionais a esse método foram desenvolvidas, incluindo o escore de avaliação motora de Bohlman (Bohlman et al., 1981), o teste motor em campo aberto (Behrmann et al., 1992) e o escore de déficits motores empregado em um modelo de TME por isquemia (Marsala e Yaksh, 1994). A reduzida sensibilidade destas

avaliações motivou a elaboração de outro teste, o BBB, assim designado por ter sido desenvolvido por Basso, Beatie e Bresnahan. Essa escala foi originalmente delineada para avaliar a recuperação locomotora de ratos submetidos a trauma contusivo leve ou moderado na ME torácica (Basso et al., 1995). Posteriormente, foi também avaliado em ratos gravemente acometidos (Basso et al., 1996) e em outros modelos de lesão medular como naqueles decorrentes de balão compressivo e hemiseccção (Metz et al., 2000; Sykova e Jendelova, 2005; Sykova et al., 2006; Urdzikova et al., 2006; Sedy et al., 2007a, b). A escala BBB é provavelmente a mais empregada para avaliar o efeito de diferentes terapias em ratos com TME (Ohta et al., 2004; Mitsui et al., 2005; Yoshihara et al., 2006; Sedy et al., 2008).

O treinamento pré-operatório dos animais no período pré-operatório não é obrigatório no teste BBB, contudo a manipulação cuidadosa com exposição destes ao campo aberto é recomendada (Scheff et al., 2002). Esse método apresenta dez categorias que refletem as variações durante a recuperação funcional e contém subdivisões e atributos específicos, que representam a ocorrência, a qualidade e a frequência dos movimentos observados em campo aberto (Basso et al., 1995). Após realização da lesão medular, os ratos são avaliados no dia seguinte ao trauma e geralmente a cada sete dias, isto durante quatro minutos (Hofstetter et al., 2002; Scheff et al., 2002; Ankeny et al., 2004; Parr et al., 2008). Segundo Mitsui et al. (2005) a observação dos animais no campo aberto durante dois minutos é suficiente, apresentando 95% de confiabilidade dos resultados.

A utilização de câmera de vídeo é recomendada especialmente para o treinamento dos avaliadores e para a comparação dos resultados nos diferentes grupos experimentais (Mitsui et al., 2005). Contudo, o teste BBB foi desenvolvido

originalmente sem o emprego de filmagem. A captação de imagens de partes do corpo do animal e também a incapacidade de avaliar os sons produzidos com a elevação dos dedos na locomoção constituem limitações da filmagem segundo os autores da escala BBB (Sedy et al., 2008).

O teste BBB baseia-se na análise de movimentos individuais dos MPs e a relação destes com os MTs, considerando também o posicionamento da cauda e a estabilidade do tronco. A classificação varia entre 0 a 21, sendo o menor valor adotado quando não ocorre atividade espontânea dos MPs (Basso et al., 1995). De acordo com Metz et al. (2000) os escores inferiores do teste BBB baseiam-se em aspectos grosseiros da locomoção, enquanto que os superiores consideram movimentos discretos não associados a recuperação motora propriamente dita. De qualquer modo, esta característica também é verificada em outras escalas comportamentais (Metz et al., 2000).

Nas fases precoce e intermediária da recuperação deambulatória, os escores do teste BBB consideram o melhor desempenho apresentado pelo animal, mesmo que este comportamento ocorra apenas uma ou duas vezes durante o período observacional. Os escores de 0 a 7 caracterizam o período precoce de recuperação e são escolhidos de acordo com os movimentos das articulações coxofemorais, femorotibiopatelares e tibiotársicas. A ausência de movimentos e a presença destes de forma discreta ou extensa são atributos aplicados nesta fase. A diferenciação entre discreto e extenso baseia-se na amplitude do movimento articular, correspondendo, respectivamente, a amplitude menor e maior do que 50% da mobilidade. Os ângulos articulares são avaliados a partir de estruturas ósseas adjacentes. Para a articulação coxofemoral é considerada a tuberosidade isquiádica, trocânter maior do fêmur e côndilo lateral

femoral. Movimentos extensos dessa articulação ocorrem quando o côndilo femoral aproxima-se da prega de pele abdominal. O ângulo da articulação femorotibiopatelar é formado pelo trocânter maior e côndilo lateral do fêmur e maléolo lateral, que ao se projetar no sentido da pelve caracteriza o movimento extenso. O côndilo lateral do fêmur, o maléolo lateral e as cabeças do metatarso definem o ângulo articular tibiotársico, sendo considerados movimentos extensos quando a pata aproxima-se do membro formando ângulos menores que 90° (Basso et al., 1995).

A fase intermediária apresenta os escores de 8 a 13 que correspondem à presença de passadas, ao posicionamento das patas e ao movimento coordenado de MTs e MPs. A transição entre os períodos precoce e intermediário inclui movimentos repetitivos de flexão e extensão das articulações coxofemorais, femorotibiopatelares e tibiotársicas, contudo o deslocamento observado caracteriza-se ainda pelo arrastar dos posteriores. O posicionamento plantar da pata sem e com suporte de peso constitui outro atributo da fase intermediária, sendo considerados como apoio a contração da musculatura do MP, extensão deste e/ou elevação dos MPs (Basso et al., 1995). Segundo Scheff et al. (2002), animais com escore 6 não estão duas vezes mais acometidos do que aqueles com escore 12. Outra característica ressaltada por estes autores é a possibilidade de se verificar em um período de duas semanas diferentes níveis de recuperação na escala BBB.

A passada normal envolve o suporte de peso com o posicionamento plantar da pata, acompanhado pelo deslocamento cranial e pelo reposicionamento plantar da pata. Os ratos podem apresentar passadas com apoio dorsal ou plantar, sendo esta característica. De acordo com a frequência observada da passada plantar classifica-se como ausente, ocasional ($\leq 50\%$ do tempo), freqüente (51-94% do tempo) e consistente (95-100% do

tempo). Segundo os autores existe dificuldade em se distinguir o deslocamento plantar freqüente do consistente, quando algumas passadas dorsais são observadas (Basso et al., 1995).

A coordenação entre os MTs e MPs é caracterizada de forma que para cada passo do MT ocorre alternadamente um passo do MP, sendo necessário observar três ou quatro passadas sequenciais. Os ratos normais podem apresentar lapsos dessa coordenação durante a locomoção. Os atributos da coordenação entre MTs e MPs são a ausência e as incidências ocasional, freqüente e consistente (Basso et al., 1995). Segundo Koopmans et al. (2005) a coordenação entre MTs-MPs é difícil de ser avaliada, mesmo quando dois observadores experientes estão envolvidos.

Na fase tardia de recuperação são considerados padrões comportamentais predominantes que se manifestam ao longo da avaliação e que refletem a continuidade do processo de reabilitação. Dentre as características verificadas estão a elevação dos dedos durante a passada, o posicionamento da pata em relação ao tronco e o posicionamento da cauda, bem como a estabilidade do tronco. Com base nestes atributos são adotados os escores 14 a 21. Os ratos são geralmente testados em uma superfície antiderrapante para que seja observada a elevação dos dedos, característica presente em animais normais. Após lesão contusiva da ME, os ratos tendem a arrastar os dedos sobre a superfície. Segundo a frequência desta alteração classifica-se a elevação dos dedos como ausente, ocasional ($\geq 50\%$ do tempo), freqüente (51-94% do tempo) e consistente (95-100% do tempo) (Basso et al., 1995).

O posicionamento predominante da pata é avaliado no contato inicial e no momento da elevação da pata, principalmente quando o animal se locomove. Em animais normais, a pata encontra-se paralela ao

tronco nestes dois instantes de observação, enquanto é observada rotação medial ou lateral da pata em animais com lesão contusiva da ME (Basso et al., 1995).

A instabilidade do tronco e o posicionamento anormal da cauda costumam persistir durante parte ou por todo período de avaliação da recuperação. O primeiro caracteriza-se como tendência de deslocamento do peso lateralmente, o que acarreta em uma deambulação com bamboleio ou “gingado”. A instabilidade parcial do tronco pode determinar o deslocamento da cauda na direção do solo. Normalmente, os ratos elevam a cauda durante a locomoção e após trauma da ME, estes tendem a posicionar a cauda sobre a superfície a fim de dar suporte ou maior estabilidade (Basso et al., 1995).

Existem limitações associadas à subjetividade do método de avaliação BBB, que podem ser minimizadas pelo emprego de dois avaliadores independentes e treinados (Basso et al., 1996; Sykova e Jendelova, 2005; Urdzikova et al., 2006). Segundo Basso (2004), em condições experimentais, os tratamentos podem interferir em alguns aspectos avaliados da locomoção, mas não em todos, podendo assim promover benefícios durante a elevação dos dedos, mas não na coordenação entre MTs e MPs. A análise assistida da deambulação, também denominada de CatWalk[®], foi proposta por Hamers et al. (2001). Neste método, o animal é primeiramente treinado para se locomover em um tubo de vidro, com 100 a 120 cm de comprimento. Durante a deambulação, o contato da pata com a superfície gera uma informação que é capturada por sistema de vídeo e armazenada em computador, para processamento em software. A análise baseia-se na sequência de passadas, na coordenação entre membros, na área de contato da pata com a superfície e na distância entre duas

passadas, bem como na duração do balanço e nas fases de apoio.

No entanto, várias modificações com melhorias foram propostas posteriormente a publicação do teste BBB, dentre estas o desenvolvimento de sub-escores (von Euler et al., 1997; Popovich et al., 1999; Lankhorst et al., 1999, Metz et al., 2000; Lankhorst et al., 2001). Com o desenvolvimento deste sub-escore ocorreu aumento da sensibilidade do teste BBB, visto que cada atributo comportamental foi classificado de forma independente, sendo a seguir, adicionado em conjunto a um escore simples (Lankhorst et al., 1999; Popovich et al., 1999; Lankhorst et al., 2001; Van Meeteren et al., 2003; Basso, 2004; Silva et al., 2008).

O escore do desempenho motor foi desenvolvido por von Euler et al. (1996) para ser empregado em modelo fotoquímico de TME. Posteriormente, este método foi adaptado por Silva et al. (2008), sendo utilizado em ratos submetidos à lesão medular contusiva. Com as modificações, foram avaliadas a capacidade motora, posicionamento proprioceptivo, posicionamento tátil, permanência no plano inclinado e a sensibilidade dolorosa.

A observação da capacidade motora é realizada colocando-se o animal em um campo aberto. A atividade espontânea do indivíduo pode variar entre ausente (escore 0), com déficit variados (escores 1, 2, 3, 4 e 5) ou normal (escore 6). Àquele com déficit mínimo ou com deambulação normal é posicionado sobre as barras de madeira, com larguras variando de 7,7 a 1,7cm. Ao se locomover na mais larga, de 7,7cm, com os quatro membros apoiados sobre a superfície, o animal é colocado em uma barra 1cm mais estreita, até a de 1,7cm. Neste caso, os escores correspondentes à locomoção nas barras são 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente para as barras de 7,7, 6,7, 5,7, 4,7, 3,7, 2,7 e 1,7cm (Silva et al.,

2008). Segundo os autores, para registro é considerada a menor barra em que o animal consegue deambular apoiando os quatro membros. Torres (2008), ao utilizar esta escala de avaliação da capacidade motora, verificou déficit acentuado nos animais com TME (escore 3), independentemente do tratamento.

Os testes de posicionamentos proprioceptivo (PP) e tátil (PT) baseiam-se na integridade dos sistemas nervoso sensorial e motor. Os impulsos sensoriais proprioceptivos são transportados até o córtex cerebral pelo fascículo grácil localizado nos funículos dorsais da ME, enquanto que a resposta motora depende de tratos localizados nos funículos ventrolaterais (Metz et al., 2000). A avaliação do PT foi proposto por Kunkel-Badgen et al. (1993). Neste teste, o animal é suspenso, mantendo-se livres os MPs, e as superfícies dorsal e lateral da pata são encostadas a borda de uma mesa ou de um papel, sem que ocorra qualquer deslocamento articular. O teste de PP é realizado de forma similar, contudo ocorre intenso envolvimento articular, quando a pata fica anormalmente posicionada (Kunkel-Badgen et al., 1993). A velocidade e acurácia no reposicionamento da pata são avaliadas, registrando-se os escores 0, 1 e 2, respectivamente para a ausência de resposta, resposta anormal e normal (von Euler et al., 1997). De acordo com Metz et al. (2000), as observações provenientes de ratos normais e com TME podem ser variáveis, não sendo recomendável realizar esses posicionamentos isoladamente. A rápida atrofia da musculatura após lesão medular também pode interferir nos achados dos exames de posicionamento. Silva et al. (2008) propuseram avaliar o PP, posicionando a superfície dorsal da pata em contato com o solo. Assim, não é necessário suspender o animal pelo tronco e as respostas observadas são as mesmas segundo estes autores.

A capacidade do animal em se manter sobre uma plataforma posicionada em diferentes ângulos, teste do plano inclinado, também faz parte do método de avaliação adaptado por Silva et al. (2008). Este teste foi primeiramente proposto por Rivlin e Tator (1977), sendo o desempenho dos ratos dependente da integridade do trato rubroespinal e de outras vias não piramidais, preservados após TME (Fehlings e Tator, 1995). De acordo com Rivlin e Tator (1977), alterações discretas não verificadas durante a observação do animal em campo aberto podem se tornar evidentes no teste do plano inclinado. Nessa avaliação, o ângulo de inclinação da plataforma é gradualmente aumentado para uma posição mais vertical, sendo registrado o maior ângulo no qual o animal permanece em posição estável por cinco segundos. Durante a observação, o animal é colocado sobre a plataforma em diferentes posições, com a cabeça voltada para cima, para baixo, para direita e para esquerda (von Euler et al., 1996). Pearse et al. (2005) propõem que a avaliação seja realizada apenas com o rato posicionado em duas direções verticais e nesta circunstância o teste é denominado de bidirecional. O ângulo observado em cada exame é comparado àquele anterior ao TME, assim animais que permanecem em um ângulo 30° menor do que antes recebem o escore 1; os com 20° escore 2; os com 10° escore 3 e os com o mesmo ângulo escore 4 (Silva et al., 2008).

Em estudo com ratos submetidos ao modelo fotoquímico de lesão medular, von Euler et al. (1996) verificaram permanência dos animais em menores ângulos imediatamente após o trauma. Nas duas semanas seguintes de avaliação, estes ratos apresentaram melhora e na sexta semana era mínima a diferença em relação ao período pré-lesão e também em relação aos animais sem trauma. Em estudos com TME do tipo contusivo, não houve, ao longo do período experimental, diferença na resposta dos

animais com TME avaliados no plano inclinado (Silva et al., 2008; Torres, 2008).

A avaliação da sensibilidade dolorosa é o teste de prognóstico mais importante do exame neurológico e constitui um indicador confiável da integridade da ME. Em lesões graves e bilaterais desta estrutura ocorre interrupção da condução sensorial nociceptiva profunda a centros superiores presentes no sistema nervoso central. Os tratos espinotalâmico, espinocervical e espinoreticular são responsáveis por conduzir esse tipo de informação sensorial. Vários são os métodos para avaliação da sensibilidade dolorosa, incluindo o teste de retirada da placa aquecida (Gale et al., 1985; Hargreaves et al., 1988; Merkler et al., 2001), testes do *spray* gelado (Yu et al., 1998; Vaquero et al., 2006) e teste de compressão da pata (Giglio et al., 2006). No método adaptado por Silva et al. (2008), a sensibilidade dolorosa é avaliada estimulando-se a prega interdigital dos MPs, com pinça hemostática de Halsted. Em resposta, o animal pode apresentar como comportamentos tentativa de morder e vocalização, além da retirada do membro estimulado. Neste exame, os escores variam entre 0, 1 e 2, respectivamente, quando a resposta está ausente, diminuída e normal. Torres (2008) observou que após 24 horas da realização do trauma medular, os ratos apresentaram ausência da sensibilidade dolorosa, havendo recuperação desta informação sensorial na primeira semana pós-lesão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi desenvolvido no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária (EV) e no Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), ambos localizados na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Realizou-se este estudo de acordo com os princípios adotados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, que emitiu o protocolo de nº33/7.

4.1. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea

As CTM da medula óssea foram obtidas segundo Azizi et al. (1998), sendo utilizados cinco ratos machos Lewis transgênicos para produção da proteína fluorescente verde (eGFP) (LEW-Tg EGFP F455/Rrrc, Rat Resource and Research Center, University of Missouri, USA). Imediatamente após a eutanásia dos animais com sobredose de isoflurano, os fêmures e tíbias foram dissecados sob técnica asséptica. Após remoção das epífises ósseas, o canal medular foi irrigado com DMEM¹, suplementado com 10% de soro fetal bovino² e antibióticos/antimicótico³ (100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 250ng/mL de anfotericina). O conteúdo proveniente da medula óssea foi centrifugado por 10 minutos a 1400g. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* contendo células foi re-suspenso e cultivado no mesmo meio em garrafas T75⁴cm², mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo das garrafas foi trocado após 24h da colheita

¹ Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA.

² Soro fetal bovino estéril, LGC Biotecnologia Ltda, Cotia, SP, Brasil.

³ Antibiotic/antimicotic, Gibco, Grand Island, NY, USA.

⁴ TPP culture flask 75cm² (cat 90076), TPP (Techno Plastic Products), Trasadingen, Switzerland.

para remoção das células não aderidas e a cada três dias. Assim que as CTM apresentaram confluência de 80 a 90%, estas foram re-suspendidas com tripsina⁵, sendo este procedimento realizado por no máximo oito vezes.

4.2. Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais por citometria de fluxo

Na oitava passagem, as CTM foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placa de 96 poços⁶ (fundo redondo) com concentração de 1x10⁶ células/poço, sendo três poços para o controle sem marcação, três poços apenas para o anticorpo secundário e dois poços para cada anticorpo primário conjugado com o secundário. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, sendo removido o sobrenadante em seguida. Em cada poço, foram adicionados 50µL do anticorpo primário (1:30) diluído em PBS 0,15M (NaCl 136,9mM; KCl 2,7mM; NaH₂PO₄ 9,6mM; KH₂PO₄ 1,5mM), incluindo anti-CD45⁷, anti-CD54⁸ e anti-CD90⁹. A placa foi incubada por 30 minutos a 4°C, sendo em seguida, centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados em cada poço 150µL de PBS 0,15M para lavagem das células. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C.

Após descarte do sobrenadante, foram adicionados em cada poço 50µL do anticorpo secundário¹⁰ diluído 1:25 em PBS 0,15M. A placa foi envolta em papel de

⁵ Trypsin 0,05%EDTA, Gibco, Grand Island, NY, USA.

⁶ TPP Tissue culture test plate 96well/round (cat 92097), TPP (Techno Plastic Products), Trasadingen, Switzerland.

⁷ CD45 (cat 610266), BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA.

⁸ CD54 (cat 554967), BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA.

⁹ CD90 (cat 554895), BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA.

¹⁰ Fluorescein-labeled Affinity Purified Antibody, (cat 02-18-06), KPL, Gaithersburg, MD, USA.

alumínio e mantida por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, foi centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, sendo descartado o sobrenadante. Em cada poço, foram adicionados 150µL de PBS 0,15M para lavagem das células, sendo a placa centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C.

Posteriormente a retirada do sobrenadante, as células foram re-suspendidas em 100µL de PBS 0,15M e 100µL de formaldeído a 4%, para leitura e análise no citômetro de fluxo FACScan¹¹. Neste foi utilizado o *software Cell Quest*¹², com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros *Forward scatter* e *Side scatter* em escala linear e FL1 (fluorescência relativa) em escala logarítmica. Foi detectada luz de comprimento de onda de 530nm, correspondente a fluorescência verde, para análises pelo programa *WinMDI* apresentados em gráficos de histogramas (Ishii et al., 2005; Tropel et al., 2005).

4.3. Animais

Foram utilizados 61 machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Lewis, com 24 semanas de idade e com peso médio de 350g. Os animais foram mantidos no Centro de Experimentação de Pequenos Animais da EV/UFMG por quatro meses, sendo acondicionados em caixas plásticas mantidas em ambiente com temperatura controlada e com ciclos de claro-escuro de 12 horas. No período experimental receberam ração comercial para roedores¹³ e água *ad libitum*.

4.4. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais:

- **Controle negativo (CN):** os animais foram submetidos à exposição da ME por meio de laminectomia em T12. Após duas semanas, foram submetidos à exposição da ME pelo acesso anteriormente realizado.
- **Inoculados com veículo (PLA):** os animais foram submetidos à laminectomia no segmento torácico T12, seguido de trauma contusivo/compressivo da ME. Após duas semanas, receberam no epicentro da lesão uma injeção de 2µL de PBS estéril (intramedular).
- **Inoculados com CTM (GCT):** os animais foram submetidos à laminectomia no segmento torácico T12, seguido de trauma contusivo/compressivo da ME. Após duas semanas, receberam no epicentro da lesão uma injeção de 2µL de PBS estéril a 0,1M, com CTM (intramedular).

¹¹ FACScan (*Fluorescence Activated Cell Analyser*), Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, USA.

¹² The Cell Quest™ Sftware, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA.

¹³ Nuvilab CR-1, Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil

Grupos experimentais	Distribuição dos animais				
	Avaliação neurológica	Avaliação histológica	RT - PCR real time (semanas após inoculação*)		
			2 ^a	3 ^a	5 ^a
Controle negativo (CN, n=9)	9	5	-	-	4
Inoculados com veículo (PLA, n=26)	9	5	4	4	4
Inoculados com CTM (GCT, n=26)	9	5	4	4	4

*Inoculação realizada no 14^o dia após a primeira cirurgia.

4.5. Protocolos anestésico e cirúrgico

Imediatamente antes da cirurgia, os animais receberam antibiótico prófilático com cefalotina sódica¹⁴ (30mg/Kg) e medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol¹⁵ (2mg/Kg), respectivamente, pelas vias intravenosa e intramuscular. A indução e a manutenção anestésicas foram realizadas com isoflurano¹⁶ fornecido por meio de máscara, empregando-se sistema aberto.

Após tricotomia e anti-sepsia da região dorsal do tronco, os ratos foram posicionados no aparelho estereotáxico desenvolvido na EV/UFMG (Fig. 1A), que dispõe de uma plataforma de polietileno, além de modelos de hastes variados, sendo possível ajustar vários pesos lançados em queda livre e em distâncias variadas.

Posteriormente à colocação do animal em decúbito ventral no aparelho, foram realizadas, na linha média dorsal, as incisões cutânea e de tecido subcutâneo, estendendo-se de T10 a L1. As inserções dos músculos epiaxiais foram incisadas e estes afastados lateralmente. Realizou-se a ostectomia do processo espinal de T12 e da lâmina dorsal da vértebra (laminectomia), empregando-se *drill* pneumático neurológico¹⁷ e microscópio cirúrgico¹⁸. A

broca do *drill* foi irrigada de forma intermitente com solução fisiológica¹⁹ para evitar o aquecimento do tecido ósseo. Imediatamente após exposição da ME, foi produzida a lesão do tipo contusiva/compressiva, utilizando-se o modelo de haste associado a peso de 70g, que permaneceu sobre a dura-máter por cinco minutos dos animais pertencentes aos grupos PLA e GCT (Fig. 1B). Após este período, o aparato foi removido e o trauma medular inspecionado. A seguir, irrigou-se o sítio cirúrgico com solução fisiológica, sendo realizada aproximação dos músculos seccionados e redução de espaço morto, com sutura padrão simples contínua com fio polipropileno²⁰ 4-0. Procedeu-se a dermorráfia com pontos simples separados utilizando-se o mesmo fio.

¹⁴ Cefalotina Ariston, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁵ Tramadon®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

¹⁶ Isoflorine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

¹⁷ ECCOS®, Aesculap Laboratórios B. Braun S.A., São Gonçalo, RJ, Brasil.

¹⁸ Opto DM Plus, Opto Eletrônica S.A., São Carlos, SP, Brasil.

¹⁹ Cloreto Cloreto de sódio a 0,9% Solução eletrolítica injetável, Laboratório Sanobiol Ltda, Pouso Alegre, MG, Brasil.

²⁰ Prolene®, Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil.

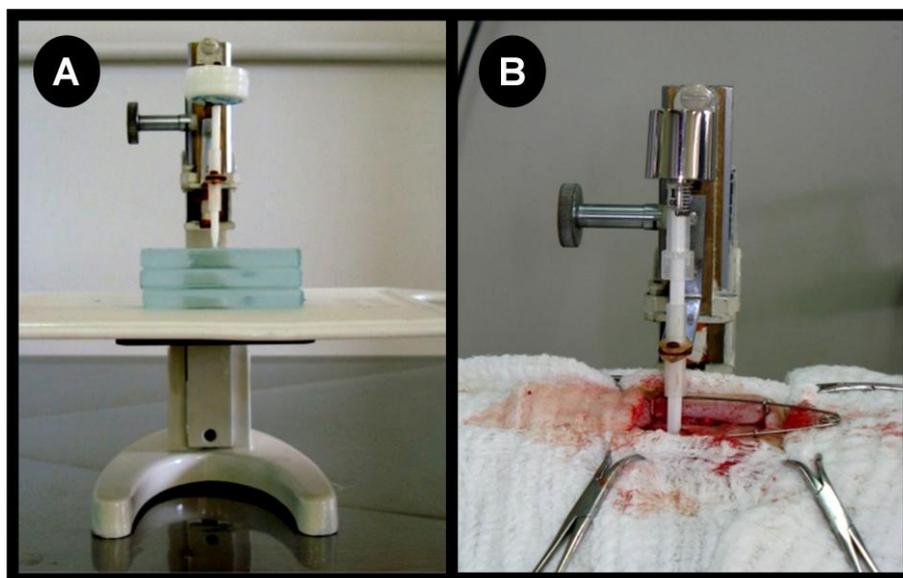


Figura 1. A) Fotografia do aparelho estereotáxico para ocasionar trauma medular, desenvolvido na EV/UFGM. B) Procedimento cirúrgico do trauma medular experimental em ratos Lewis, momento da lesão medular do tipo contusiva/compressiva, utilizando-se o modelo de haste associado a peso de 70g.

Imediatamente após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas aquecidas até completa recuperação anestésica. Foram administrados como antibiótico e analgésico, respectivamente, cefalexina sódica (30mg/Kg) e cloridrato de tramadol (2mg/Kg), ambos por via oral a cada 12 horas, durante cinco dias consecutivos. Realizou-se massagem abdominal nos animais duas vezes ao dia até que estes retornassem a apresentar o controle do esvaziamento vesical. As alterações relacionadas à função urinária foram registradas. Os pontos de pele foram removidos nove dias após o procedimento cirúrgico.

4.6. Preparação das CTM para o transplante celular

Imediatamente antes da inoculação, que ocorreu duas semanas após a primeira intervenção cirúrgica, removeu-se o meio de cultivo presente nas garrafas T75cm² contendo CTM e se realizou lavagem destas por três vezes com 10mL de PBS. Após a remoção desta solução, as CTM foram re-

suspendidas com 2mL de tripsina²¹ que permaneceu na garrafa por cinco minutos. Em seguida, adicionaram-se 2mL de DMEM²², suplementado com 10% de soro fetal bovino²³ e antibióticos/antimicótico²⁴, sendo este meio removido e centrifugado por 10 minutos a 1400g. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* contendo células foi re-suspendido com 2mL de DMEM e homogeneizado. Deste meio, obtiveram-se 2μL que foram misturados a 49μL de PBS 0,1M e 49μL de azul de tripan (diluído 2:3 em PBS 0,1M). Após homogeneizados, foram colocados 10μL desta mistura na câmara de Neubauer e as CTM viáveis e inviáveis contadas, sendo com isso determinado o volume a ser acrescentado às CTM, para uma concentração final de 7,5 x 10⁴ de células/μL.

²¹ Trypsin 0,05%EDTA, Gibco, Grand Island, NY, USA.

²² Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA.

²³ Soro fetal bovino estéril, LGC Biotecnologia Ltda, Cotia, SP, Brasil.

²⁴ Antibiotic/antimicotic, Gibco, Grand Island, NY, USA.

4.7. Inoculação de veículo ou de CTM

Após duas semanas da intervenção cirúrgica, os ratos foram submetidos a novo procedimento cirúrgico para exposição da medula espinal, adotando-se o mesmo protocolo anestésico e cirúrgico descritos no item anterior. Nos animais pertencentes aos grupos inoculados com veículo (*PLA*) ou com CTM (*GCT*) foi administrada, no epicentro da lesão (intramedular), uma injeção a velocidade de 0,4 μ L/min, com auxílio de uma microbomba de infusão conectada a uma seringa de Hamilton de 10 μ L²⁵ e agulha 30G²⁶. Nos ratos do grupo *PLA* foram administrados 2 μ L de PBS estéril (0,1M) (NaCl 136,9mM; KCl 2,7mM; NaH₂PO₄ 9,6mM; KH₂PO₄ 1,5mM) e nos do *GCT*, 2 μ L de PBS estéril (0,1M) com 1,5 x 10⁵ de CTM, em uma concentração de 7,5 x 10⁴ de células/ μ L (Fig 2).

²⁵ Seringa 1701 RN-HP 10 μ L SYR, Hamilton Company, Reno, NV, USA.

²⁶ Agulha Gengival (30G/0,3x21mm), Injecta Produtos Odontológicos, Diadema, SP, Brasil



Figura 2. Fotografias do segundo procedimento cirúrgico (14º dia pós-trauma), momento em que se inoculou o veículo (PBS) ou as células tronco mesenquimais (CTM) na medula espinal de ratos Lewis submetidos a trauma medular. A) Verificar a microbomba de infusão conectada a uma seringa de Hamilton de 10µL. B) Observar a agulha 30G posicionada na medula espinal, local da laminectomia e do trauma medular (seta branca).

4.8. Avaliação neurológica

As avaliações neurológicas basearam-se no teste BBB (Basso et al., 1995) (Tab. 1) e no método de escala descritiva adaptado por Silva et al. (2008) (Tab. 2).

Inicialmente, com o intuito de facilitar a avaliação neurológica pós-traumática, os animais foram acostumados ao campo aberto e ao manejo dos experimentadores, incluindo o estímulo à movimentação. Essa habituação foi realizada quatro dias antes do início das cirurgias e constou da colocação dos ratos, dois a dois, em uma área de 1m², durante cinco minutos. Em seguida, os animais foram posicionados sobre as barras de madeira para que pudessem deambular sobre estas estruturas. No momento em que os animais demonstravam segurança e interesse para explorar o ambiente e se locomoviam sobre

as barras, passaram a ser testados individualmente. Durante esse período de habituação, os ratos permaneceram também na plataforma do plano inclinado, por 10 segundos, em cada ângulo de observação.

As avaliações foram realizadas 24 horas antes do primeiro procedimento cirúrgico e, no período pós-operatório foram realizadas 24h após a primeira e segunda intervenções cirúrgicas, respectivamente no 1º e 15º dia, bem como a cada quatro dias, durante 45 dias consecutivos (4º, 8º, 12º, 16º, 20º, 24º, 28º, 32º, 36º, 40º e 44º). Em cada dia de avaliação, os animais foram filmados no campo aberto durante 2 minutos e, ao final do período experimental, dois avaliadores assistiram aos filmes sem conhecer o tratamento ao qual cada animal havia sido submetido.

Tabela 1. Protocolo do teste BBB (Basso, Beatie e Bresnahan) para avaliação do desempenho locomotor, com os respectivos escores.

ESCORE	DESEMPENHO LOCOMOTOR
0	Não observado movimento do MP
1	Movimento discreto de uma ou de duas articulações, usualmente a coxofemoral e/ou femorotibiopatelar
2	Movimento extensivo de uma articulação ou movimento extensivo de uma articulação e discreto de uma outra articulação
3	Movimento extensivo de duas articulações
4	Movimentos discretos de todas três articulações do MP
5	Movimentos discretos de duas articulações e movimentos extensivos da terceira
6	Movimentos extensivos de duas articulações e movimentos discretos da terceira
7	Movimentos extensivos de todas as três articulações
8	Passadas sem suporte de peso ou posicionamento plantar da pata sem suporte de peso
9	Posicionamento plantar da pata com suporte de peso apenas na fase de apoio (i.e. quando parado) ou passada dorsal com suporte de peso ocasional, freqüente ou consistente e ausência de passada plantar
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional, ausência de coordenação entre MA-MP
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e ausência de coordenação entre MA-MP
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação ocasional entre MA-MP
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação freqüente entre MA-MP
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente entre MA-MP e a posição predominante da pata durante a locomoção é rotacionada (interna ou externamente) quando do contato inicial com a superfície ou antes da elevação no final da fase de apoio Ou passada plantar freqüente, coordenação consistente entre MA-MP e passada dorsal ocasional
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MA-MP; elevação dos dedos ausente ou ocasional durante o deslocamento do membro para frente; posicionamento predominante da pata é paralelo ao corpo durante o contato inicial
16	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MA-MP durante a deambulação; freqüente elevação dos dedos durante o deslocamento do membro para frente; posicionamento predominante da pata é paralelo ao corpo durante o

	contato inicial e rotacionada na elevação
17	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MA-MP durante a deambulação; frequente elevação dos dedos durante o deslocamento do membro para frente; posicionamento predominante da pata é paralelo ao corpo durante o contato inicial e na elevação
18	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MA-MP durante a deambulação; elevação dos dedos consistentemente durante o deslocamento do membro para frente; posicionamento predominante da pata é paralelo ao corpo durante o contato inicial e rotacionada na elevação
19	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MA-MP durante a deambulação; e a elevação dos dedos ocorre consistentemente durante o deslocamento do membro para frente; posicionamento predominante da pata é paralelo ao corpo durante o contato inicial e na elevação; e a cauda está para baixo, parte do tempo ou por todo tempo
20	Passada plantar consistente e coordenação consistente entre MA-MP durante a deambulação; elevação dos dedos consistente; posicionamento predominante da pata é paralelo ao corpo durante o contato inicial e na elevação; cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco
21	Passada plantar consistente e deambulação coordenada; elevação dos dedos consistente; posicionamento predominante da pata é paralelo ao corpo durante o toda fase de apoio; estabilidade do tronco e cauda consistentemente elevada

O exame neurológico adaptado por Silva et al. (2008) consistiu na observação da capacidade motora e dos posicionamentos proprioceptivo e tátil, bem como da permanência em estação no plano inclinado e da avaliação da sensibilidade dolorosa (Tab. 2).

A deambulação foi avaliada durante a filmagem e baseou-se na observação da atividade espontânea do animal no campo aberto. Neste momento, também foi avaliado o posicionamento proprioceptivo da pata, sendo consideradas como critérios a ausência, a diminuição e a presença de propriocepção quando a pata do MP ficava com a face plantar em contato com a superfície do campo aberto. Posteriormente, os animais foram colocados sobre as barras de madeira, com espessuras progressivamente mais estreitas. As barras foram apoiadas em cavaletes a 60cm de altura e tinham um metro de extensão, com

larguras variando entre 7,7 a 1,7cm e, com diferença de 1cm entre elas. Foi considerada, para registro de escore, a menor barra em que o animal conseguiu se locomover apoiando os quatro membros.

O teste do posicionamento tátil foi realizado com o animal suspenso pelo tronco, mantendo-se os MPs livres e, em seguida, as superfícies dorsais e laterais das patas foram estimuladas encostando-as na borda de uma mesa. Como respostas foi observado o reposicionamento da pata, sendo os escores 0, 1 e 2, para a ausência de resposta, resposta diminuída e normal, respectivamente.

A avaliação do animal no plano inclinado consistiu em colocá-lo em duas posições verticais opostas sobre uma plataforma emborrachada com 28x30cm. Durante a execução do teste, a plataforma foi posicionada em inclinações que variaram de

30° a 70°. Essa angulação foi gradualmente aumentada para uma posição mais vertical, sendo registrada a maior inclinação na qual o animal permaneceu em posição estável por 5 segundos nas duas posições.

A sensibilidade dolorosa foi testada com o emprego de estímulo manual das pregas

interdigitais lateral e medial dos MPs. Foram consideradas como percepção da dor pelo animal as manifestações comportamentais como a tentativa de retirada do membro estimulado, juntamente com a tentativa de morder e/ou a vocalização do animal.

Tabela 2. Protocolo de avaliação neurológica com os respectivos escores para capacidade motora, posicionamento proprioceptivo, posicionamento tátil, permanência em plano inclinado e sensibilidade dolorosa.

ESCORE	AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA
	CAPACIDADE MOTORA
0	Ausência de movimentos nos MPs, sem apoio de peso
1	Movimento sutil e desconexo dos MPs, sem apoio de peso
2	Movimento bem visível nos MPs, sem apoio de peso
3	Apoio de peso nos MPs e deambulação com déficit acentuado
4	Deambulação com déficit moderado
5	Deambulação com déficit discreto, sem se locomover na barra de 7,7cm
6	Deambulação normal ou com déficit discreto e se locomove na barra de 7,7cm
7	Locomoção na barra de 6,7cm
8	Locomoção na barra de 5,7cm
9	Locomoção na barra de 4,7cm
10	Locomoção na barra de 3,7cm
11	Locomoção na barra de 2,7cm
12	Locomoção na barra de 1,7cm
	POSICIONAMENTO PROPRIOCEPTIVO
0	Ausente
1	Diminuída
2	Normal
	POSICIONAMENTO TÁTIL
0	Ausente
1	Diminuída
2	Normal
	PLANO INCLINADO
1	Permanece em um ângulo 30° menor do que no período pré-cirúrgico
2	Permanece em um ângulo 20° menor do que no período pré-cirúrgico
3	Permanece em um ângulo 10° menor do que no período pré-cirúrgico
4	Permanece no mesmo ângulo do que no período pré-cirúrgico
	SENSIBILIDADE DOLOROSA
0	Ausente
1	Diminuída
2	Normal

4.9. Avaliação microscópica da medula espinal

Cinco animais dos grupos *CN*, *PLA* e *GCT* foram submetidos à eutanásia sob anestesia geral com isoflurano²⁷ oferecido por meio de máscara, na 5ª semana pós-inoculação (correspondente ao 49º dia após a primeira cirurgia). A seguir, foram necropsiados e as ME dissecadas e fixadas em formol a 4% tamponado com PB (0,1M; pH 7,4), overnight a 4°C. Foi obtido um segmento da ME com 1,0cm de comprimento, que incluiu a região cranial ao epicentro do trauma, o epicentro e a região caudal ao epicentro. Posteriormente, este segmento foi mantido oito horas a 4°C em solução de sacarose²⁸ a 10% dissolvida em PB (0,1M; pH 7,4) e por mais oito horas em solução de sacarose a 20% dissolvida no mesmo tampão. Após este período, o segmento foi embebido em meio próprio para congelação²⁹ e acondicionado em criotubo. Este foi congelado à -30°C mediante imersão em recipiente contendo n-Hexano³⁰, previamente resfriado em nitrogênio líquido. Em seguida, o criotubo foi estocado em freezer a -80°C para posterior processamento.

Foram obtidos, em criostato, cortes seriados transversais da ME com espessura de 16µm, incluindo a região cranial ao epicentro do trauma, o epicentro e a região caudal ao epicentro. Em cada lâmina previamente silanizada³¹ foram colocados oito seções sequenciais da ME, sendo ao todo processadas 50 lâminas/animal que foram numeradas e estocadas a -20°C.

A morfologia geral da ME foi avaliada, em microscópio óptico, a partir da coloração das seções histológicas pela técnica de hematoxilina-eosina³² (H.E.) (Luna, 1968).

4.9.1. Avaliações imunoistoquímicas a) Identificação de neurônios

A identificação de neurônios pelo anticorpo NeuN foi realizada utilizando-se 12 lâminas/animal, que incluíam as três regiões estudadas. As lâminas foram hidratadas com alcoóis absolutos 1, 2 e 3, alcoóis diluídos 90%, 80% e 70%, e a seguir com água (5 minutos cada). Posteriormente, foi realizada recuperação antigênica por aquecimento em microondas, colocando-se as lâminas em solução tampão citrato³³ a 0,05% (10mM) em água deionizada (pH=5,9 a 6,1), por 10 minutos. A seguir, as lâminas foram mantidas na mesma solução em temperatura ambiente por mais 20 minutos, sendo então realizadas três lavagens com PBS (NaCl 123,2mM; Na₂HPO₄ 10,4mM; NaH₂PO₄ 3,6mM) (5 minutos cada). O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio³⁴ a 3% em álcool metílico³⁵, em câmara escura por 30 minutos e em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS (5 minutos cada) e os epítomos inespecíficos foram bloqueados com *protein block*³⁶ por 30 minutos também em câmara úmida e escura. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal (Neu-N 1:500)³⁷ diluído em PBS, sendo mantidas *overnight* a 4°C na câmara úmida e escura. Após este

³²H&E – Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA.

³³Ácido cítrico, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brasil.

³⁴Peróxido de hidrogênio, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brasil.

³⁵Álcool metílico, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brasil.

³⁶Protein Block(Serum Free), (cat X-0909), Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA.

³⁷Anti – NeuN, (cat MAB377) Chemicon Internacional Inc., Temecula, CA, USA.

²⁷Isoflorine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

²⁸Sucrose, Invitrogen, Life Technologies, CA, USA.

²⁹Jung Tissue Freezing Medium (cat.14020108926), Leica Microsystems, Nussloch, Germany.

³⁰n-Hexane, Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

³¹(3-Aminopropyl)triethoxysilane, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA.

período, foram realizadas três lavagens com PBS (5 minutos cada), sendo então incubadas com o anticorpo secundário³⁸, por 45 minutos em temperatura ambiente, na câmara úmida e escura. Realizaram-se três lavagens com PBS (5 minutos cada) e em seguida, foi adicionado o complexo estreptoavidina biotina peroxidase³⁹, sendo mantida a incubação por 30 minutos na câmara úmida e escura em temperatura ambiente. Posteriormente, as secções histológicas foram reveladas com 3-3'' diaminobenzidina peroxidase (DAB)⁴⁰ por 15 segundos, sendo lavadas em água corrente por 10 minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris, com posterior lavagem em água corrente por 10 minutos. Após estas etapas, procedeu-se a desidratação com alcoóis 70%, 80%, 90% (3 minutos cada), alcoóis absolutos 1, 2 e 3 (10 minutos cada), e xilol 1 e 2 (15 minutos cada), seguida da montagem das lâminas com lamínulas e bálsamo do Canadá. A contagem dos corpos neuronais marcados com anti-NeuN foi realizada em microscópio óptico, utilizando-se objetiva de 20x. Foram observados, em cada lâmina, nove campos localizados na substância cinzenta, e após a contagem dos corpos neuronais, os dados foram expressos em médias e desvios-padrão.

b) Identificação por imunofluorescência da proteína fluorescente verde (eGFP), da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e da sinaptofisina

Para identificação da GFAP, foram utilizadas duas lâminas por animal, incluindo as regiões adjacentes cranial e caudal ao epicentro do trauma. Foram

observados, em cada lâmina, cinco campos distribuídos nos funículos dorsais, laterais e ventrais da substância branca. Em relação à sinaptofisina e à eGFP, foi selecionada uma lâmina do epicentro da lesão para cada imunomarcação. O anticorpo anti-sinaptofisina foi observado em quatro campos distribuídos nos cornos dorsais e ventrais da substância cinzenta, enquanto que o anti-eGFP foi avaliado nas substâncias branca e cinzenta.

As secções foram hidratadas com três alcoóis absolutos e então com dois alcoóis diluídos a 95% e 80% (5 minutos cada), sendo a seguir imersas em água deionizada por 15 minutos. Realizaram-se três lavagens com PBS (5 minutos cada) e em seguida, foi realizada permeabilização das membranas celulares, por 10 minutos, com solução de PBS a 0,15M (pH=7,2) acrescido de Triton X 0,1%⁴¹. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS (5 minutos cada), seguido do bloqueio das peroxidases endógenas com solução de peróxido de hidrogênio⁴² a 3% em álcool metílico⁴³, em câmara escura por 30 minutos e em temperatura ambiente. Após este período, foram realizadas duas lavagens com PBS (5 minutos cada), sendo as lâminas incubadas, por 1h, para bloqueio dos epítomos inespecíficos com solução de PBS a 0,15M (pH=7,2) acrescido de 5% de soro de ovelha inativado e 1% de albumina sérica bovina. Realizou-se recuperação antigênica por aquecimento em banho-maria, colocando-se as lâminas em solução tampão com citrato⁴⁴ a 0,05% (10mM) (pH=5,9 a 6,1) por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram mantidas na mesma solução em temperatura ambiente por 20 minutos, sendo então realizadas três lavagens com

³⁸LSAB™, Link for AP/HRP (cat k0690), Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA.

³⁹LSAB™, Streptavidin/HRP (cat k0690), Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA.

⁴⁰Liquid DAB (cat k3468), Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA DAB, DAKO, EUA.

⁴¹Triton® X-100, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA.

⁴²Peróxido de hidrogênio, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brasil.

⁴³Alcool metílico, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brasil.

⁴⁴Ácido cítrico, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, SP, Brasil.

PBS (5 minutos cada). Posteriormente, as secções foram incubadas, por 2h na câmara úmida e escura em temperatura ambiente, com os anticorpos primários anti-GFAP⁴⁵ (1:200) ou anti-sinaptofisina⁴⁶ (1:200) ou anti-eGFP⁴⁷ (1:1000), diluídos em solução de PBS 0,15M acrescido de 1% de albumina sérica bovina. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS (5 minutos cada), sendo as secções incubadas por 1h na câmara úmida e escura, com o anticorpo secundário fluorescente (1:1000)⁴⁸, diluído em solução de PBS 0,15M acrescido de 1% de albumina sérica bovina. Aos 30 minutos desta incubação, as lâminas receberam DAPI na concentração de 1:1200, diluído em solução de PBS 0,15M. Posteriormente, realizaram-se três lavagens com PBS (5 minutos cada) e montagem das lâminas e lamínulas com meio aquoso não fluorescente⁴⁹. Em cada bateria foi incluído uma lâmina controle negativo, em que o anticorpo primário foi substituído por PBS e, na bateria de identificação da eGFP foi incluída também uma lâmina controle positivo proveniente de um animal transgênico para esta proteína. As lâminas permaneceram protegidas da luz, até o momento da leitura que ocorreu em um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 200M equipado com sistema ApoTome, utilizando-se o filtro 555nm e a objetiva de 20x.

Os níveis de brilho e contraste foram ajustados de forma padronizada, utilizando-se o software *ImageJ* (versão 1.33u, *National Institutes of Health, USA*). Para cada imagem, quantificou-se, de forma sistemática e com o auxílio deste software, a densidade integrada de pixels, sendo

⁴⁵Anti-GFAP, Invitrogen, Life Technologies, USA.

⁴⁶Anti-Synaptophysin, Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA.

⁴⁷Anti-GFP, Invitrogen, Life Technologies, USA.

⁴⁸Alexa Fluor® 555 goat anti-rabbit IgG (H+L) (cat A21428), Invitrogen, Life Technologies, CA, USA.

⁴⁹Hydromount, (cat HS106), National Diagnostics, USA.

então calculada a média aritmética e os resultados foram apresentados em médias.

4.9.2. Identificação de células em apoptose pela técnica do TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase – TdT dUTP nick end labeling*)

Para identificação das células em apoptose, foi utilizada uma lâmina/animal da região do epicentro do trauma. A secção foi hidratada com dois alcoóis absolutos (5 minutos cada) e com três alcoóis diluídos a 90%, 80 e 70% (3 minutos cada). Realizaram-se duas lavagens com TBS (NaCl 140mM e Tris base 20mM), (pH 7,6), 5 minutos cada e em seguida, foi realizada permeabilização das membranas celulares, por 10 minutos, com solução de Triton X 0,5%, diluído água destilada. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com TBS (5 minutos cada), seguido da incubação das lâminas com *Proteinase K* 0,02% em Tris base (10mM)⁵⁰, em câmara úmida e escura por 20 minutos. Após este período, foram realizadas duas lavagens com TBS (5 minutos cada), seguido do bloqueio das peroxidases endógenas com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em álcool metílico, por 30 minutos em câmara úmida e escura. Realizaram-se duas lavagens com TBS (5 minutos cada), sendo as lâminas então incubadas com *TdT Equilibration Buffer*, em câmara úmida e escura por 20 minutos. A seguir, foram incubadas por 1 h e 30 minutos com *TdT Labeling Reaction Mixture*, em câmara úmida e escura e, em temperatura de 37°. Foi realizada uma lavagem com TBS e com *Stop Solution* (5 minutos cada), sendo então lavadas por duas vezes com TBS (5 minutos cada). A seguir, as lâminas receberam *Blocking Buffer*, por 10 minutos em câmara úmida e escura. Nesta mesma condição, foram

⁵⁰Tris (Hidroximetil) Aminometano BUP, JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA.

incubadas por 30 minutos com *IX Conjugate*, sendo então lavadas por duas vezes com TBS (5 minutos cada). Posteriormente, as secções histológicas foram reveladas com 3-3'' diaminobenzidina (DAB) em peróxido de hidrogênio, por 15 minutos, sendo então lavadas em água deionizada por 10 minutos. A contra-coloração foi realizada com *Methyl Green* por 4 minutos, sendo então mergulhadas com delicadeza em dois alcoóis absolutos por 2 segundos cada. A seguir, foram mergulhadas em xilol (5 minutos), sendo realizada a montagem das lâminas com lamínulas e bálsamo do Canadá. A contagem dos corpos apoptóticos foi realizada em microscópio óptico, utilizando-se objetiva de 20x. Foram observados, em cada lâmina, quinze campos distribuídos nas substâncias cinzenta e branca.

4.10. RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores neurotróficos BDNF, NT-3 e fatores associados a apoptose Bcl-xl, Bax e caspase-9

a) Comparação entre grupos experimentais e delineamento dos primers

Quatro animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia sob anestesia geral com isoflurano⁵¹, duas, três e cinco semanas após a segunda cirurgia, momento da inoculação do veículo ou das CTM. Os animais foram necropsiados e um segmento de 4mm da ME foi colhido (correspondente ao epicentro da laminectomia e/ou do trauma) e, imediatamente congelado a -80°C, para posterior processamento. Na 2ª e 3ª semanas foram avaliados os grupos com trauma e inoculados com veículo (*PLA*) ou com CTM (*GCT*). Na 5ª semana, pós-transplante, realizou-se a comparação dos grupos com trauma, *PLA* e *GCT*, em relação ao controle negativo (*CN*).

Em relação aos genes de interesse, foram escolhidos os primers do BDNF, neurotrofina-3, Bcl-xl e Bax, caspase-9 e beta-actina de acordo com as especificações necessárias para a realização da RT-PCR em tempo real (Tab. 3).

⁵¹Isoflorine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

Tabela 3. Genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.

<i>Gene</i>	<i>Número de acesso</i>	<i>Sequência do iniciador e tamanho do produto</i> <i>Referência</i>
BDNF	NM_012513.3	Forward: 5''CACAATGTTCCACCAGGTG 3'' Reverse: 5''TGGGCGCAGCCTTCAT 3'' Tamanho do produto: 89 pares de bases Rodrigues Hell et al., 2009
Neurotrofina 3	NM_031073.2	Forward: 5''TGTGACAGTGAGAGCCTGTGG 3'' Reverse: 5''TGTAACCTGGTGTCCCCGAA 3'' Tamanho do produto: 69 pares de bases Vaynman et al., 2006
Bcl-xl	NM_001033670.1	Forward: 5''CCCCAGAAGAAACTGAACCA 3'' Reverse: 5''AGTTTACCCCATCCCGAAAG 3'' Tamanho do produto: 300 pares de bases Li et al., 2005b
Bax	NM_017059.1	Forward: 5''CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC 3'' Reverse: 5''AGTTGCCATCAGCAAACATGTCA 3'' Tamanho do produto: 147 pares de bases Nagel et al., 2010
Caspase-9	NM_031632.1	Forward: 5''TGGAGGAGGCTGACCGGCAA 3'' Reverse: 5''CCACAGCTCCGCGACTTGCA 3'' Tamanho do produto: 77 pares de bases
Beta-actina	NM_031144.2	Forward: 5''GCGTCCACCCGCGAGTACAA 3'' Reverse: 5''ACATGCCGGAGCCGTTGTCTG 3'' Tamanho do produto: 118 pares de bases

b) Isolamento do RNA

A extração do RNA foi realizada adicionando-se 1mL do reagente TRIzol⁵² em cada ME, que foi mantida resfriada até a descongelação, sendo então realizada a maceração da amostra, com auxílio de haste de plástico estéril, livre de RNAses e DNAses. O período de incubação com este reagente foi de 5 minutos e a seguir foram adicionados 200µL de clorofórmio (por mL de TRIzol), com vigorosa agitação por 15 segundos e outra incubação por mais 5 minutos, sob resfriamento. As amostras foram centrifugadas a 11400g por 15 minutos a 4°C, para formação das três

fases. A fase aquosa (transparente) foi então transferida para novo tubo, onde foram adicionados 500µL de álcool isopropílico para precipitação do RNA. As amostras foram congeladas a -80° por 30 minutos e após este período foram descongeladas e centrifugadas a 11400g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi hidratado com 1mL de etanol a 75% (por mL de TRIzol). As amostras foram centrifugadas a 11400g por 5 minutos a 4°C e então o sobrenadante foi descartado por cuidadosa inversão dos tubos. Estes ficaram secando em temperatura ambiente com as respectivas tampas abertas, por aproximadamente 5 minutos. A seguir para solubilizar o RNA, adicionaram-se 20µL de água ultra-pura

⁵²Trizol, Invitrogen, Life Technologies, CA, USA.

DEPC⁵³, sendo as amostras mantidas por 10 minutos a 55°C. Posteriormente, em outro tubo adicionaram-se 98µL de água ultra-pura DEPC e 2µL do RNA diluído (1:50), sendo que aquelas amostras foram congeladas para posterior confecção do DNA complementar (cDNA). Realizou-se a quantificação do RNA diluído em espectrofotômetro de luz UV, por meio da avaliação das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280nm.

c) Síntese do cDNA

A confecção do cDNA foi realizada por meio da reação da transcriptase reversa, utilizando-se o *Kit* comercial⁵⁴. O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0µg de RNA total, sendo em cada amostra adicionados reagentes deste *Kit*, incluindo 10µL de 2xRT, 2µL de RT e água (até completar 8µL com o RNA), em um volume final de 20µL. As amostras foram incubadas em termociclador, sendo os ciclos de 25° por 10 minutos, 42° por 50 minutos e 85° por 5 minutos. A seguir, adicionou-se 1µL de RNAase H e então as amostras foram incubadas a 37° por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -20°C, para realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-real time).

d) Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Para realização da PCR em tempo real, preparou-se para cada amostra uma mistura contendo 12,5µL de SYBR Green e 1,0µL de Rox (diluído 1:10) presentes no *kit* (cat.11735032), bem como 7,0µL de água ultra-pura, 1µL do primer *forward* e 1,0µL do *reverse* do gene estudado (concentração de 5pmol/µL da solução estoque a

100pmol/µL). Posteriormente, foram também adicionados, a esta mistura, 2,5µL do cDNA, perfazendo-se um volume final de 25µL. Em todas as reações, foi incluído controle negativo, em que se substituiu o cDNA por igual volume de água ultra-pura. A seguir, realizou-se a PCR em tempo real com auxílio de plataforma de instrumentação *ABI Prism 7900*, adotando-se 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para anelamento e 1 minuto a 75°C para extensão, seguido de mais 10 minutos a 75° para término da reação.

Os resultados foram apresentados pelo *Software 7500 v.2.0.1 Applied Biosystems*, em gráficos de fluorescência em relação ao número de ciclos. O ciclo em que foi detectada fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) foi denominado de ciclo de *threshold* (*Ct*), assim quanto maior a expressão de um gene, mais cópias foram sintetizadas no início do ciclo e menor foi o *Ct*.

A quantificação do gene de interesse foi determinada em relação ao gene da beta-actina, que se apresenta como normalizador por estar presente nos tecidos de forma constitutiva e não apresentar influência do tratamento. Desta forma, para cada amostra avaliada, o valor de *Ct* relativo ao mRNA alvo foi normalizado em relação ao valor do *Ct* da beta-actina, gerando o valor de delta *Ct*. Posteriormente, esses valores foram comparados ao delta *Ct* médio do grupo controle negativo (*CN*), formando o delta delta *Ct* que foi submetido ao método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para análise relativa dos resultados da transcrição (Livak and Schmittgen, 2001). Estes cálculos foram realizados para as amostras das ME provenientes da 5ª semana pós-segunda cirurgia. Para as amostras da 2ª e 3ª semanas, obtiveram-se os valores de delta *Ct* e estes foram submetidos à expressão $(10^{-\Delta Ct/3,3}) * 1000$, sendo assim demonstrado o número de

⁵³Ultra-pure® DEPC-treated water, Gibco, Invitrogen, CA, USA.

⁵⁴SuperScript® III Platinum® Two-Step qRT-PCR with SYBR Green, Invitrogen (cat.11735032), CA, USA.

cópias do gene avaliado em relação ao gene normalizador.

4.11. Análise estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas no tempo. Os dados referentes à expressão de BDNF (2ª semana), NT-3 (2ª e 3ª semanas) e Bax (5ª semana) foram submetidos à transformação de $\sqrt{x+1}$, enquanto que os dados do Bcl-xl (2ª semana) à transformação de \log_{10} . Estas e as demais variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância, com comparação de médias pelo teste Tukey. Para análise dos resultados da avaliação neurológica expressos em escores, utilizaram-se os testes não paramétricos de Friedman para comparação das medianas dentro do grupo e de Mann-Whitney para comparação das medianas entre os grupos experimentais. A análise estatística foi realizada com auxílio do pacote estatístico *GraphPad InStat*, sendo adotado como nível de significância 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea

As CTM da medula óssea de ratos Lewis, transgênicos para produção da eGFP, foram

cultivadas em meio próprio até a oitava passagem, sendo mantidas indiferenciadas nesse período. No momento em que estas células apresentavam-se confluentes, assumiam forma celular espiculada semelhante a de fibroblastos (Fig. 3), característica morfológica também observada por Friedenstein et al. (1976).

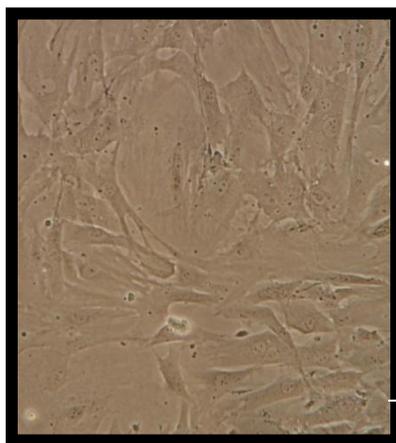


Figura 3. Fotomicrografia de células tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea de ratos, cultivadas em garrafa T75cm² contendo DMEM e 10% de soro fetal bovino. Notar a característica morfológica das células (Barra = 50µm).

Com o cultivo, as CTM foram purificadas, devido à seletiva aderência que apresentavam na superfície plástica da garrafa T75cm². O grau de pureza dessas células determinado pela marcação dos CD45, CD54 e CD90 foi compatível com os critérios estabelecidos pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of International Society for Cellular Therapy*. Como observado na Figura 4, apenas 2,45% das CTM apresentaram-se marcadas para o antígeno CD45, e em relação aos anticorpos CD54 e CD90, houve imunomarcação de 82,27e 87,89%, respectivamente. A

caracterização fenotípica das CTM da medula óssea é necessária, uma vez que não estão presentes marcadores celulares específicos e nesse local também se encontram fibroblastos (Ishii et al., 2005) e células tronco hematopoiéticas (Thuret et al., 2006). Dentre as moléculas apresentadas por estes dois tipos celulares ocorre a expressão de CD45 (Pittenger et al., 1999; Ishii et al., 2005), enquanto que as expressões de CD54 e CD90 ocorrem nas CTM (Dominici et al., 2006), resultado semelhante ao do presente estudo.

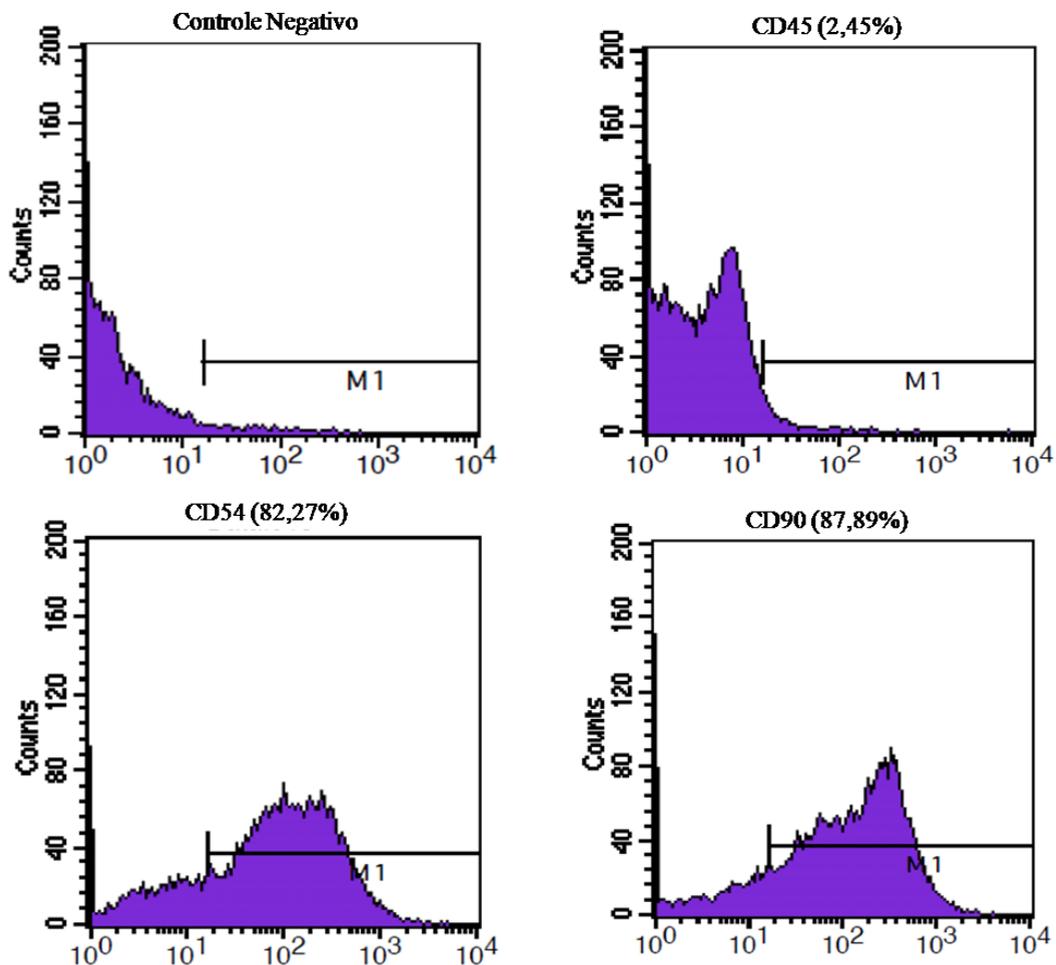


Figura 4. Histogramas da citometria de fluxo com o padrão de expressão das moléculas de superfície presentes em células tronco mesenquimais da medula óssea de ratos. Estas células apresentaram imunomarcagem de 2,45% para o antígeno CD45, 82,27% para o CD54 e 87,89% para o CD90. (M1: corresponde à imunomarcagem positiva das células acima de 10^1).

5.2. Procedimentos cirúrgicos

O modelo experimental de trauma medular, utilizado no presente estudo, foi eficiente em induzir a injúria no tecido nervoso. A realização de duas intervenções em cada animal mostrou-se viável, sendo fundamental o emprego de rígidos princípios de assepsia e de protocolo anestésico seguro, bem como de cuidados intensivos no período pós-operatório.

Os animais pertencentes aos grupos com trauma (PLA e GCT) apresentaram

alterações no esvaziamento vesical e déficits deambulatórios. A retenção urinária com cistite hemorrágica ocorreu em aproximadamente 85% desses animais, nos primeiros três dias de observação pós-trauma. A incapacidade de esvaziamento voluntário da bexiga ocorre, comumente, como consequência da lesão medular na região toracolombar, com o consequente comprometimento do neurônio motor superior que torna o esfíncter uretral espástico. Os pacientes acometidos podem apresentar desconforto e infecções ascendentes do trato urinário, bem como

hidronefrose e insuficiência renal aguda (Meyer et al., 2003; Leung et al., 2007). As massagens abdominais foram essenciais para amenizar a retenção urinária e suas complicações, sugerindo-se, portanto, o acompanhamento diário dos indivíduos e o emprego de cuidados de enfermagem para minimizar a perda de animais.

Na segunda intervenção, foi possível identificar, em todos os animais, o local exato da cirurgia que se apresentou como uma depressão de 5 mm de diâmetro na coluna vertebral entre T11 e T13 (Fig. 2B). A medula espinal estava recoberta por um tecido cicatricial não exuberante, característica também relatada por Kakulas (1984). Comumente em estudos relacionados a trauma medular não é realizado segundo acesso cirúrgico como o do presente estudo, ou se realizado até nove dias após a primeira intervenção (Hofstetter et al., 2002; Ankeny et al., 2004; Ohta et al., 2004; Lu et al., 2007; Mitsui et al., 2005; Parr et al., 2008; Paul et al., 2009), período em que o tecido cicatricial apresenta-se menos evidente. De qualquer forma com base nos resultados é possível inferir que se for necessário outro acesso cirúrgico ao mesmo local, pode-se realizá-lo em um período mais tardio e sem danos à ME.

A escolha da administração de CTM pela via intralésional baseou-se no estudo de Vaquero et al. (2006), em que foi comparado o efeito das CTM transplantadas no local da injúria medular ou por via sistêmica em ratos com TME. Esses autores verificaram maior número de células no epicentro da lesão, quando estas foram administradas no próprio local, sendo também observada melhor recuperação funcional. Os resultados indicaram que as células transplantadas diretamente na ME apresentaram maior sobrevivência e com isso promoveram benefícios na regeneração do tecido nervoso, observação esta que

determinou o emprego da via intralésional no presente estudo.

5.3. Avaliações comportamentais

Os métodos de avaliação comportamental adotados foram de fácil execução, sendo que a associação do teste BBB e do método de escala descritiva permitiu avaliar com maior acurácia a presença de recuperação funcional após a lesão medular. Essas metodologias facilitaram a avaliação da integridade dos sistemas sensorial e motor, relacionados à deambulação, muito embora tenha ocorrido sobreposição dos resultados observados.

O condicionamento prévio de quatro dias antes da intervenção cirúrgica foi necessário para que os ratos se acostumassem com a manipulação e assim houvesse redução do estresse durante as avaliações. No primeiro dia de habituação, foi observado comportamento associado a estresse e medo, incluindo tentativa de fuga do campo aberto e defecação excessiva, enquanto que nas barras os ratos não se locomoviam, mesmo nas mais espessas como nas de 7,7 e 6,7cm. O treinamento com dois animais simultaneamente reduziu a ansiedade e permitiu com isso que explorassem melhor o ambiente, executando de forma adequada as tarefas propostas. No quarto dia de habituação (período pré-cirúrgico ou dia 0) já foi possível avaliá-los individualmente, sendo registrados valores correspondentes a normalidade em todos os animais.

Após a realização da cirurgia e durante todo o período observacional, verificaram-se, em ambas as metodologias, escores máximos para os animais pertencentes ao grupo *CN*. Estas observações são importantes por indicarem que a exposição da medula espinal por meio da laminectomia não causou lesões ao tecido nervoso, isto provavelmente devido à forma meticulosa com que foi realizada (Tab. 4, 5, 6 e 7). Em

estudos relacionados a trauma medular também não são relatados déficits neurológicos nos animais submetidos apenas a exposição da ME (Silva et al., 2008; Torres, 2008).

Os animais pertencentes aos grupos *PLA* (inoculados com veículo) e *GCT* (inoculados com CTM) apresentaram, no primeiro dia pós-trauma, déficits neurológicos caracterizados por ausência de movimentação à movimentação discreta dos MPs, classificados como 0 e 1, tanto no

teste BBB (Tab. 4) quanto no teste da capacidade motora (Tab. 5). Foi observada que a lesão medular não determinou perda da sensibilidade dolorosa superficial, contudo os animais apresentaram ausência de resposta (escore 0) nos posicionamentos proprioceptivo (Tab. 6) e tátil (Fig. 5). Adicionalmente, quando os ratos foram posicionados sobre o plano inclinado permaneceram em um ângulo 30° menor do que antes da cirurgia (escore 1) (Tab. 7).

Tabela 4. Teste de Basso, Beatie e Bresnahan com as medianas de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - *CN*) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (*PLA*) ou inoculados com células tronco mesenquimais (*GCT*), avaliados durante 45 dias.

Dias de avaliação	<i>CN</i> (n=9)	<i>PLA</i> (n=9)	<i>GCT</i> (n=9)
0°	21 ^{A,a}	21 ^{A,a}	21 ^{A,a}
1°	21 ^{A,a}	1 ^{B,b}	0 ^{B,b}
4°	21 ^{A,a}	2 ^{B,b}	1 ^{B,b}
8°	21 ^{A,a}	2 ^{B,b}	5 ^{B,b}
14° 12°	21 ^{A,a}	6,5 ^{B,b}	7 ^{B,b}
15°	21 ^{A,a}	6,5 ^{B,b}	7,5 ^{B,b}
16°	21 ^{A,a}	6,5 ^{B,b}	8 ^{B,b}
20°	21 ^{A,a}	6 ^{B,c}	8 ^{A,b}
24°	21 ^{A,a}	6,5 ^{B,c}	8 ^{A,b}
28°	21 ^{A,a}	6,5 ^{B,c}	8 ^{A,b,c}
32°	21 ^{A,a}	7 ^{A,c}	8,5 ^{A,b}
36°	21 ^{A,a}	7,5 ^{A,c}	9 ^{A,b}
40°	21 ^{A,a}	7,5 ^{A,b}	8,5 ^{A,b}
44°	21 ^{A,a}	7,5 ^{A,b}	8,5 ^{A,b}

Medianas seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Friedman ($p>0,05$). Medianas seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p>0,05$). (Dias 0° = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; 1° = 24 horas após o procedimento cirúrgico; 14° = inoculação de veículo ou de CTM; 15° = 24 horas após o segundo procedimento cirúrgico).

No período entre as avaliações do 4° ao 12° dia pós-trauma, verificou-se que a atividade motora apresentou evolução clínica, caracterizada por movimentos extensivos de todas as articulações dos MPs. No teste BBB este comportamento corresponde ao

escore 7 e na escala numérica descritiva, ao 2. Como se pode observar nas Tabelas 4 e 5, não houve diferença entre as medianas dos grupos *PLA* e *GCT* ($p>0,05$), o que era de se esperar uma vez que até esse momento os animais não haviam sido submetidos ao tratamento, que ocorreu no

14° dia pós-trauma. Em relação a recuperação funcional espontânea observada em ambos os grupos com trauma, pode ter ocorrido devido a

formação de novas conexões entre os neurônios não acometidos pelo trauma, como demonstrado por Bareyre et al. (2004).

Tabela 5. Teste da capacidade motora com as medianas de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - *CN*) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (*PLA*) ou os inoculados com células tronco mesenquimais (*GCT*), avaliados durante 45 dias.

	Dias de avaliação	<i>CN</i> (n=9)	<i>PLA</i> (n=9)	<i>GCT</i> (n=9)
	0°	12 ^{A,a}	12 ^{A,a}	12 ^{A,a}
	1°	12 ^{A,a}	0 ^b	0 ^{B,b}
	4°	12 ^{A,a}	1 ^{B,b}	1 ^{B,b}
	8°	12 ^{A,a}	1 ^{B,b}	1 ^{B,b}
14°	12°	12 ^{A,a}	1 ^{B,b}	2 ^{B,b}
	15°	12 ^{A,a}	1 ^{B,c}	2 ^{B,b}
	16°	12 ^{A,a}	1 ^{B,c}	2 ^{B,b}
	20°	12 ^{A,a}	1,5 ^{B,c}	2 ^{B,b}
	24°	12 ^{A,a}	2 ^{A,b}	2 ^{A,b}
	28°	12 ^{A,a}	2 ^{A,b}	2 ^{A,b}
	32°	12 ^{A,a}	2 ^{A,b}	2,5 ^{A,b}
	36°	12 ^{A,a}	2 ^{A,b}	3 ^{A,b}
	40°	12 ^{A,a}	2 ^{A,b}	2,5 ^{A,b}
	44°	12 ^{A,a}	2 ^{A,b}	2,5 ^{A,b}

Medianas seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Friedman ($p>0,05$). Medianas seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p>0,05$). (Dias 0° = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; 1° = 24 horas após o procedimento cirúrgico; 14° = inoculação de veículo ou de CTM; 15° = 24 horas após o segundo procedimento cirúrgico).

Os animais apresentaram, ainda no período entre o 4° e 12° dia pós-trauma, ausência de resposta (escore 0) nos testes de posicionamento proprioceptivo (Tab. 6) e tátil (Fig. 5) e, quando posicionados sobre o plano inclinado conseguiram permanecer

em um ângulo 20° menor do que antes da cirurgia (escore 2) (Tab. 7). Neste período de avaliação, não houve diferença estatística entre os grupos com trauma, para estas variáveis ($p>0,05$).

Tabela 6. Teste do posicionamento proprioceptivo com as medianas de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - *CN*) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (*PLA*) ou os inoculados com células tronco mesenquimais (*GCT*), avaliados durante 45 dias.

Dias de avaliação	<i>CN</i> (n=9)	<i>PLA</i> (n=9)	<i>GCT</i> (n=9)
0°	2 ^{A,a}	2 ^{A,a}	2 ^{A,a}
1°	2 ^{A,a}	0 ^{B,b}	0 ^{B,b}
4°	2 ^{A,a}	0 ^{B,b}	0 ^{B,b}
8°	2 ^{A,a}	0 ^{B,b}	0 ^{B,b}
12°	2 ^{A,a}	0 ^{B,b}	0 ^{B,b}
14°	2 ^{A,a}	0 ^{B,b}	0,5 ^{B,b}
15°	2 ^{A,a}	0 ^{B,c}	1 ^{B,b}
16°	2 ^{A,a}	0 ^{B,c}	1 ^{B,b}
20°	2 ^{A,a}	0 ^{B,c}	1 ^{B,b}
24°	2 ^{A,a}	0 ^{B,c}	1 ^{B,b}
28°	2 ^{A,a}	0 ^{B,c}	1 ^{A,b}
32°	2 ^{A,a}	0 ^{A,B,b}	1 ^{A,b}
36°	2 ^{A,a}	0,5 ^{A,c}	1 ^{A,b}
40°	2 ^{A,a}	0,5 ^{A,c}	1 ^{A,b}
44°	2 ^{A,a}	0,5 ^{A,c}	1 ^{A,b}

Medianas seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Friedman ($p > 0,05$). Medianas seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p > 0,05$). (Dias 0° = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; 1° = 24 horas após o procedimento cirúrgico; 14° = inoculação de veículo ou de CTM; 15° = 24 horas após o segundo procedimento cirúrgico).

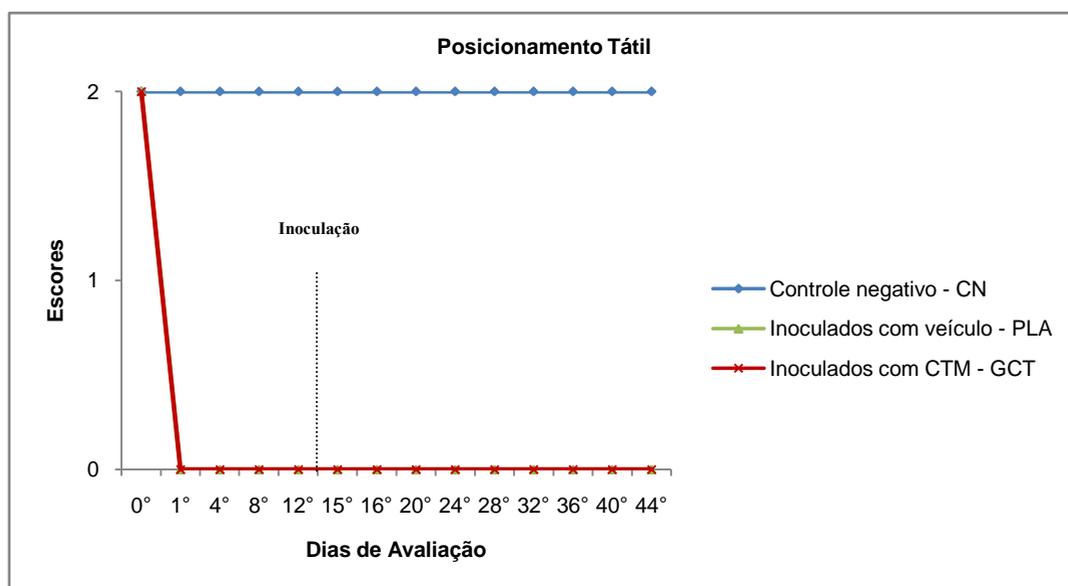


Figura 5. Gráfico do teste de posicionamento tátil, mostrando os escores (medianas) de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - *CN*) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (*PLA*) ou os inoculados com células tronco mesenquimais (*GCT*), avaliados durante 45 dias. (Dias 0° = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; 1° = 24 horas

após o procedimento cirúrgico; 14° = inoculação de veículo ou de CTM; 15° = 24 horas após o segundo procedimento cirúrgico).

Tabela 7. Teste do plano inclinado com as medianas de ratos Lewis submetidos à laminectomia (controle negativo - *CN*) ou ao trauma medular, incluindo os inoculados com veículo (*PLA*) ou os inoculados com células tronco mesenquimais (*GCT*), avaliados durante 45 dias.

	Dias de avaliação	<i>CN</i> (n=9)	<i>PLA</i> (n=9)	<i>GCT</i> (n=9)
	1°	4 ^{A,a}	1 ^{B,b}	1 ^{A,b}
	4°	4 ^{A,a}	1 ^{B,b}	1 ^{A,b}
	8°	4 ^{A,a}	1 ^{B,b}	1 ^{A,b}
	12°	4 ^{A,a}	2 ^{Bb}	2 ^{A,b}
14°	15°	4 ^{A,a}	2 ^{A,b}	2,5 ^{A,b}
	16°	4 ^{A,a}	2 ^{A,b,c}	3 ^{A,b}
	20°	4 ^{A,a}	2 ^{A,c}	3 ^{A,b}
	24°	4 ^{A,a}	2 ^{A,c}	3 ^{A,b}
	28°	4 ^{A,a}	2 ^{A,c}	3 ^{A,b}
	32°	4 ^{A,a}	2 ^{A,b}	3 ^{A,b}
	36°	4 ^{A,a}	2 ^{A,b}	3 ^{A,b}
	40°	4 ^{A,a}	2 ^{A,b}	3 ^{A,b}
	44°	4 ^{A,a}	2 ^{A,b}	3 ^{A,b}

Medianas seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Friedman ($p>0,05$). Medianas seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney ($p>0,05$). (Dias 0° = 24 horas antes do procedimento cirúrgico; 1° = 24 horas após o procedimento cirúrgico; 14° = inoculação de veículo ou de CTM; 15° = 24 horas após o segundo procedimento cirúrgico).

Interessante foi o fato de não haver diferença estatística na comparação entre as medianas dos grupos *PLA* e *GCT* nos dias 15 e 16, em relação ao 12° dia ($p>0,05$) (Tab. 4, 5, 6 e 7). Esperava-se que a injeção intralésional pudesse ocasionar danos mínimos ao tecido nervoso e com isso os animais apresentassem imediata piora clínica no período pós-tratamento, seguida de recuperação funcional, principalmente para aqueles tratados com CTM. A lesão tecidual decorrente da punção à medula espinal foi mínima devido ao reduzido volume administrado (2µL em ambos os grupos tratados), ao tamanho da agulha (30G) e a lenta velocidade de infusão (0,4µL/min), o que em conjunto não acarretou em piora da função locomotora no período imediato ao tratamento. A administração intralésional de CTM, quando realizada imediatamente após o TME, não possibilita a avaliação do efeito

da punção propriamente dita, visto que neste período são intensas as alterações locais decorrentes da injúria (Hofstetter et al., 2002; Ohta et al., 2004; Lu et al., 2007). De qualquer forma, pode-se perceber que o tratamento intralésional realizado nas condições do presente estudo não promoveu agravamento do quadro clínico, constituindo assim interessante via de administração terapêutica.

Na avaliação da capacidade motora, pela escala numérica descritiva, foi possível observar diferença estatística entre as medianas dos grupos inoculados com veículo (*PLA*) ou com CTM (*GCT*) no 15°, 16° e 20° dia ($p<0,05$) (Tab. 5). Os animais do grupo *PLA* apresentavam ainda movimentos desconexos dos MPs (escore 1), enquanto que os do *GCT* estavam com movimentos bem visíveis dos MPs, sem apoio de peso (escore 2). O resultado do teste BBB na comparação entre as medianas

dos grupos *PLA* e *GCT* no 20°, 24°, 32° e 36° dia de avaliação, demonstrou diferença estatística ($p < 0,05$) (Tab. 4). Nesse intervalo, os animais inoculados com CTM já apresentavam passadas dorsais e suporte de peso plantar em estação (escore 9), enquanto que os outros apresentavam apenas movimentos extensivos das três articulações (escore 7). Os resultados do teste do plano inclinado foram semelhantes ao BBB, contudo a diferença estatística entre as medianas dos grupos *PLA* e *GCT* ocorreu nos dias 20, 24 e 28 ($p < 0,05$) (Tab. 7). De acordo com esses resultados, percebeu-se que as duas metodologias foram complementares na observação da recuperação funcional. A avaliação da capacidade motora pela escala numérica descritiva sugere uma resposta ao tratamento com CTM em um período mais precoce, contudo foi com a utilização do teste BBB que se constatou um efeito prolongado dessa terapia.

Nos dias seguintes ao 36° dia de avaliação, houve também melhora no padrão locomotor dos animais com trauma e inoculados com veículo (*PLA*), não sendo possível constatar diferença entre os grupos com trauma ($p > 0,05$) (Tab. 4 e 5). Paralelamente, a avaliação dos resultados dos animais inoculados com CTM (*GCT*), nesse período, indicam que ocorreu interrupção da evolução clínica ou até mesmo piora do quadro, como observado nas Tabelas 4 e 5. Estudos com o uso de CTM no trauma medular têm apresentado resultados conflitantes quanto à recuperação funcional após o transplante celular (Lu et al., 2004; Himes et al., 2006). Os achados variáveis do exame neurológico podem ser decorrentes dos diferentes protocolos terapêuticos, principalmente em relação ao tipo e ao número de células transplantadas, ao local de administração e ao tempo de tratamento após a injúria medular.

Independente do tratamento, a recuperação locomotora dos animais traumatizados ao

final do período experimental foi caracterizada pela presença de passadas dorsais ou do posicionamento plantar da pata sem apoio de peso nos MPs. Nesse período, a apresentação clínica foi estatisticamente semelhante ao período pré-cirúrgico (dia 0) ($p > 0,05$) (Tab. 4, 5, 6 e 7). Comumente, estudos experimentais com lesão medular não realizam a comparação das medianas entre os tempos de avaliação dentro do mesmo grupo, talvez porque a análise estatística iguale escores que clinicamente são diferentes. No presente trabalho, utilizou-se o teste de Friedman para realizar essa comparação, sendo observada semelhança entre alterações deambulatórias com a normalidade do período pré-trauma ($p > 0,05$) (Tab. 4 e 5). Este fato pode ser atribuído ao próprio teste estatístico ou às metodologias observacionais aqui utilizadas. Assim, sugere-se que a recuperação funcional possa ser avaliada com o emprego de outros testes comportamentais capazes de detectar diferenças mais sutis.

5.4. Avaliação microscópica da medula espinal

Ao exame histológico da ME dos animais pertencentes ao grupo controle negativo (*CN*), não foram evidenciadas alterações no segmento torácico, local da laminectomia. A ME apresentava preservação da arquitetura normal, sendo verificadas as substâncias cinzenta e branca e, externamente, as meninges (Fig. 6A). Observou-se a disposição em “H” ou borboleta da substância cinzenta (Fig. 6D), com proporção constante dos seus constituintes, incluindo vasos sanguíneos, neurônios e células da glia (astrócitos, oligodendrócitos e micróglia) (Fig. 6G e 6J). Na substância branca era mantida também a proporção de fibras axonais, células da neuróglia e vasculatura (Junqueira e Carneiro, 2004). Estas observações são importantes, pois evidenciaram que a exposição da medula

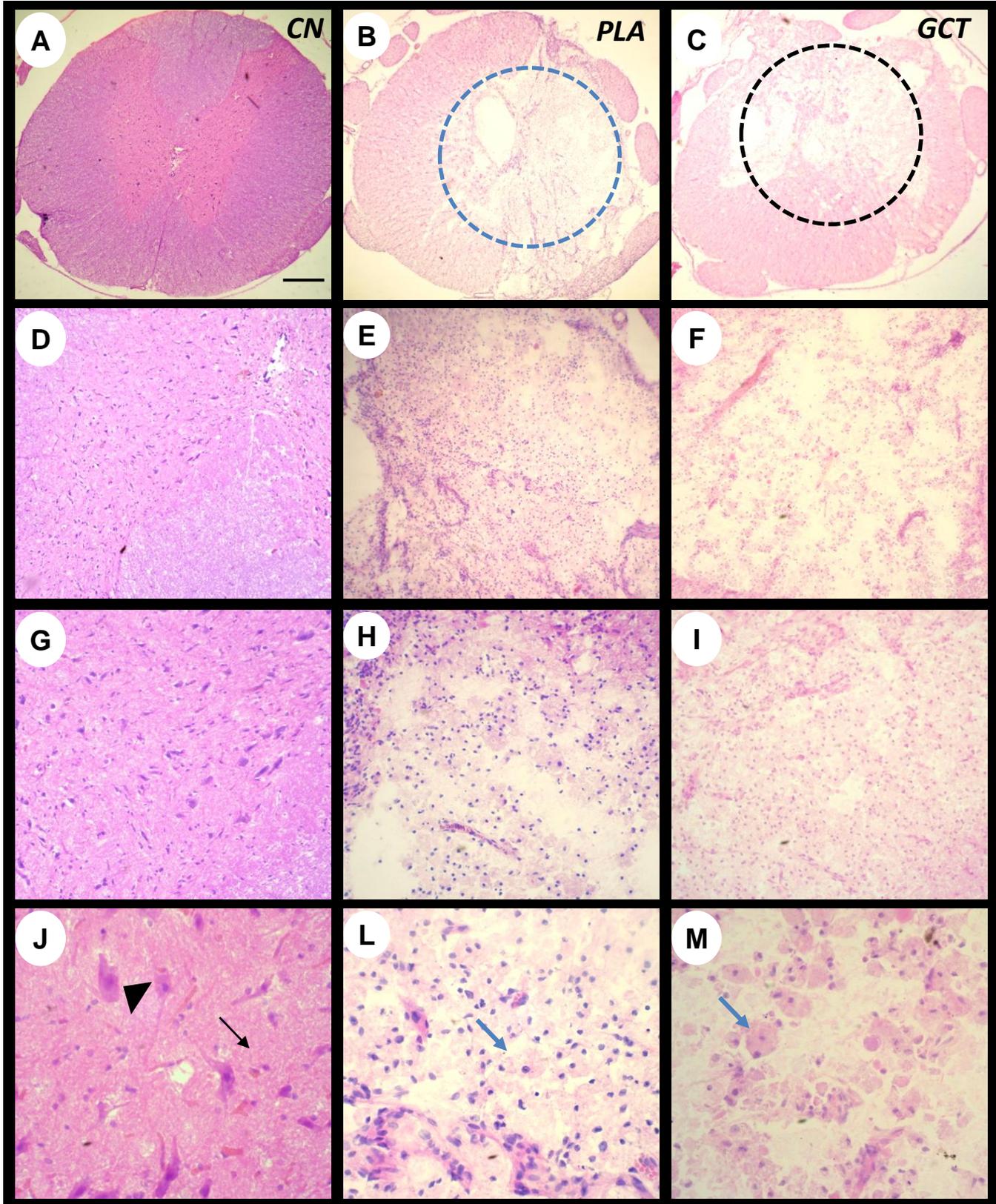
espinal não ocasionou injúrias ao tecido nervoso, fato já comprovado pelos escores máximos apresentados ao exame neurológico dos animais do grupo *CN*.

Em relação aos animais com trauma, houve no epicentro da lesão medular perda da arquitetura normal, isto independente do grupo *PLA* ou *GCT*, respectivamente, Figuras 6B-E e 6C-F. Foi observada presença de uma área de necrose expandindo-se dos funículos dorsais e dorsolaterais da substância branca, bem como dos cornos dorsais e ventrais da substância cinzenta (Fig. 6E e 6F). Assim esta alteração caracterizou-se por mielomalácia focalmente extensa e intensa, com extensão de aproximadamente dois terços da área da ME e com o acometimento das duas substâncias. Contudo, foi a substância cinzenta que se apresentou mais afetada, fato esperado uma vez que a demanda metabólica requerida nesta região é maior.

Na região da necrose havia proliferação principalmente de células da glia e células

de Gitter (Fig. 6H-I-L-M) e na substância branca adjacente foi também verificada degeneração balonosa multifocal discreta, sendo raras as câmaras de digestão. Com base nestas observações, pode-se perceber que o trauma contusivo/compressivo desencadeado por um peso de 70g e com permanência de cinco minutos sobre a ME, foi eficiente em promover uma lesão de intensidade grave, semelhante entre os grupos com trauma (*PLA* e *GCT*). Este resultado está de acordo com o desempenho locomotor apresentado pelos animais com TME, que apresentaram passadas dorsais ou posicionamento plantar da pata sem apoio de peso nos MPs, havendo, contudo, recuperação mais precoce nos animais inoculados com CTM (*GCT*). Assim qual seria o efeito das células transplantadas, já que em relação à extensão e intensidade da lesão não houve diferença entre os grupos com trauma. Poderiam ter promovido maior neuroplasticidade, seja na preservação neuronal ou de seus constituintes ou, ainda limitado a apoptose?

Figura 6. Fotomicrografias de secções transversais da medula espinal de ratos Lewis coradas em H.E, na 5ª semana pós-inoculação. Figuras 6A-D-G-J) Medula espinal de um animal do grupo controle negativo – *CN*. A) Verificar a morfologia normal, com as substâncias cinzenta e branca. D) Verificar o formato em „H“ da substância cinzenta. G) Observar a proporção dos constituintes celulares no corno dorsal da substância cinzenta. J) Observar os neurônios (cabeça de seta) e células da glia (seta preta). Figuras 6B–E-H-L) Medula espinal de um animal do grupo inoculado com veículo – *PLA*. B) Observar a perda da arquitetura normal e a extensão da área de mielomalácia (área circundada com tracejado azul). E) Observar a mielomalácia. H) Verificar a proliferação de células. L) Observar a presença de células da glia e de Gitter (seta azul). Figuras 6C-F-I-M) Medula espinal de um animal pertencente ao grupo inoculado com células tronco mesenquimais – *GCT*. C) Observar a perda da arquitetura normal e a extensão da mielomalácia (área circundada com tracejado preto). F) Observar a mielomalácia. I) Observar a proliferação de células. M) Verificar a presença de células da glia e de Gitter (seta azul) (Figuras 6A-B-C: barra = 500µm; figuras 6D-E-F: barra = 200µm; figuras 6G,H,I: barra = 100µm; figuras 6J-L-M: barra = 50µm).



a) Imunoistoquímica com o anticorpo anti-NeuN

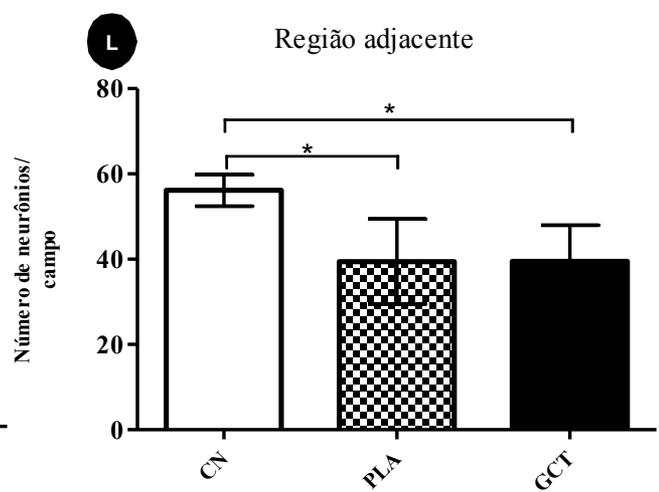
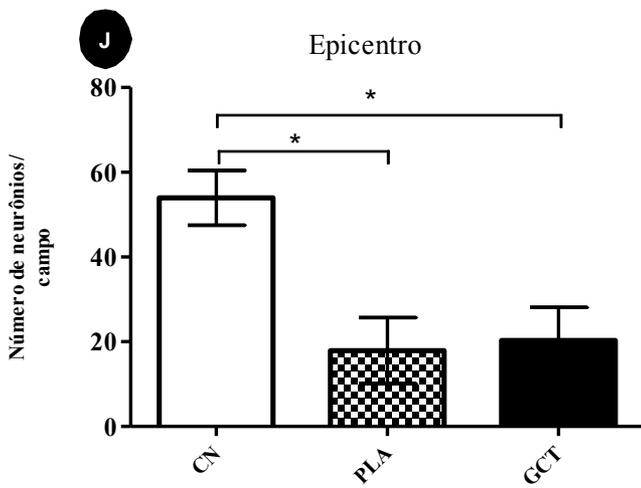
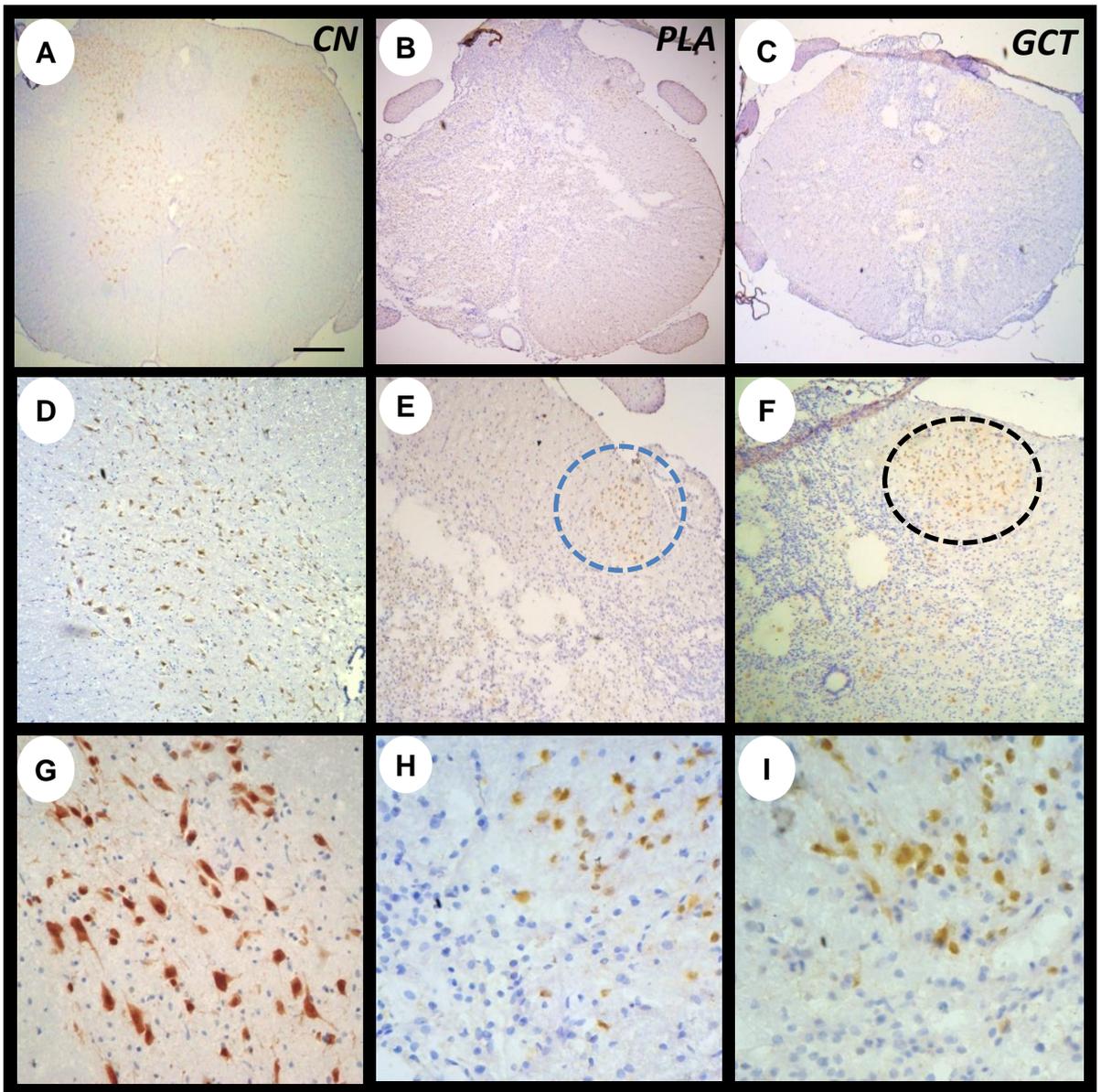
A imunomarcagem dos neurônios com o anticorpo anti-NeuN permitiu avaliar os efeitos do trauma, bem como do tratamento sobre a preservação neuronal. A utilização deste anticorpo na imunoistoquímica constitui ferramenta importante, amplamente empregada em diferentes estudos com lesões do sistema nervoso central (Wolf et al., 1996). Isto se deve ao fato da proteína NeuN ser expressa, exclusivamente, em neurônios desde o desenvolvimento até a fase adulta dos indivíduos. De acordo com Mullen et al. (1992), esta molécula está envolvida diretamente na diferenciação neuronal e na caracterização bioquímica, tanto *in vitro* como *in vivo*.

No presente estudo, foram avaliadas 12 lâminas por animal, sendo observada uma extensão da medula espinal correspondente a aproximadamente cinco milímetros. Com isso foi possível abranger o epicentro da lesão medular propriamente dito (Fig. 7A a 7I) e as regiões imediatamente adjacentes. A contagem das células imunomarcadas com o anticorpo NeuN demonstrou diferença significativa entre o controle negativo (CN) e os demais grupos com trauma (PLA e GCT) ($p < 0,05$) (Fig. 7J-L), em ambas as regiões estudadas.

O trauma medular contusivo/compressivo, produzido nos animais pertencentes aos grupos PLA e GCT, desencadeou uma lesão de intensidade grave, como descrita anteriormente na avaliação histológica (Figuras 6B-C). Deste modo, logo após a

lesão deve ter ocorrido morte de elevado número de células, principalmente daquelas com maior demanda metabólica, como dos neurônios. Além disso, na fase inicial pós-trauma, uma série de outros eventos possivelmente também se desenvolveu e contribuiu para a propagação da lesão tecidual. Várias são as referências a respeito das alterações secundárias e suas consequências no TME (Ducker et al., 1978; Lohse et al., 1980; Colter e Rucker, 1988; Shores, 1992), bem como de terapias no intuito de modular estes eventos (Gaviria et al., 2000; Cayli et al., 2004; Lu et al., 2004; Himes et al., 2006; Silva et al., 2008; Torres et al., 2010). No presente estudo, pretendia-se, com a reposição intralésional de células, criar um ambiente favorável com menos morte neuronal, porém de acordo com os resultados da contagem de neurônios, este fato não foi evidenciado (Fig. 7J-L). A escolha da inoculação de CTM no 14º dia foi feita, baseando-se no pressuposto de que neste período a reação inflamatória não seria tão pronunciada, havendo assim menor formação de radicais livres, eucosanóides, dentre outras citocinas inflamatórias, que pudessem interferir nos efeitos das CTM. Contudo, ao se considerar a natureza complexa do trauma medular grave, como o deste estudo, possivelmente a combinação de tratamentos pudesse ser uma estratégia mais adequada. A administração de fármacos na fase aguda, a exemplo do dantrolene sódico, que já demonstrou proteger a medula espinal pela diminuição da apoptose (Torres et al., 2010), poderia ser uma abordagem interessante, paralelamente, ao transplante de CTM em um período subcrônico.

Figura 7. Fotomicrografias de secções transversais da medula espinal de ratos Lewis, na região do epicentro da laminectomia e submetidas à imunohistoquímica com anti-NeuN, na 5ª semana pós-inoculação. Figuras 7A-D-G) Medula espinal de um animal do grupo controle negativo – *CN*. A) Observar a imunomarcagem de corpos neuronais (NeuN-positivos) distribuídos por toda substância cinzenta. D) Marcação de corpos neuronais (NeuN-positivos) no corno dorsal da substância cinzenta. G) Observar a presença de numerosos corpos neuronais (NeuN-positivos). Figuras 7B–E-H) Medula espinal de um animal do grupo inoculado com veículo – *PLA*. B) Observar a perda da arquitetura normal e a escassez da imunomarcagem de neurônios. E-H) Observar a reduzida imunomarcagem de corpos neuronais (NeuN-positivos) no corno dorsal da substância cinzenta (tracejado azul), confirmada pela análise quantitativa representada nos gráficos 7J-L. Figuras 7C-F-I) Medula espinal de um animal do grupo inoculado com células tronco mesenquimais – *GCT*. C) Observar a perda da arquitetura normal e a escassez da imunomarcagem de neurônios. F-I) Observar a reduzida imunomarcagem de corpos neuronais (NeuN-positivos) no corno dorsal da substância cinzenta (tracejado preto), confirmada pela análise quantitativa representada nos gráficos 7J-L. J) Gráfico das médias e dos desvios-padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos/campo, presentes na região do epicentro da laminectomia de de ratos Lewis, na 5ª semana pós-inoculação. K) Gráfico das médias e dos desvios-padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos/campo, presentes nas regiões adjacentes a laminectomia de ratos Lewis, na 5ª semana pós-inoculação (controle negativo – *CN*, inoculados com veículo - *PLA* e inoculados com células tronco mesenquimais - *GCT*). Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). (Figuras 7A-B-C: barra = 500 μ m; figuras 7D-E-F: barra = 200 μ m; figuras 7G,H,I: barra = 100 μ m).



b) Imunofluorescência com os anticorpos anti-eGFP, anti-GFAP e anti-sinaptofisina

Em relação à identificação das CTM inoculadas nos ratos do grupo *GCT*, empregou-se o anticorpo para a proteína fluorescente verde (eGFP), visto que as células transplantadas eram provenientes de animais transgênicos para esta proteína.

Deste modo, foi possível verificar a presença das CTM no local da lesão, principalmente, nos funículos dorsais da substância branca, sendo também localizadas nos cornos dorsais da substância cinzenta (Fig. 8). Assim, as CTM inoculadas no 14º dia pós-trauma sobreviveram até a 7ª semana, momento em que os animais foram submetidos à eutanásia.

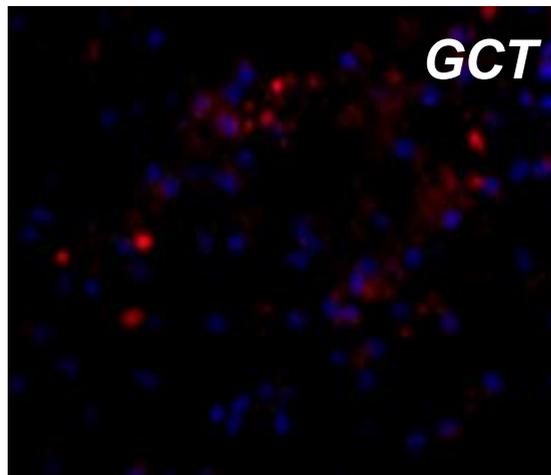


Figura 8. Fotomicrografia de secção transversal da medula espinal de ratos Lewis, na região do epicentro do trauma e submetidas à imunistoquímica com anti-eGFP, na 5ª semana pós-inoculação das CTM. Observar a imunomarcagem de células tronco mesenquimais transgênicas para a proteína fluorescente verde (eGFP) (em vermelho) e imunomarcagem de núcleos de outras células (em azul pelo DAPI), localizados na substância branca de um animal do grupo inoculado com células tronco mesenquimais (*GCT*). (200x).

Outro aspecto também avaliado foi a intensidade da reação glial, isto a partir da imunomarcagem da proteína fibrilar glial (GFAP). Posteriormente à lesão do SNC, células da meninge, da micróglia e da macróglia migram para o local acometido a fim de isolar a região e com isso atenuar a extensão dos processos inflamatório e degenerativo (Yiu e He, 2006). Para tanto, as células tornam-se reativas, destacando-se o astrócito hipertrofiado que apresenta aumento na produção de proteínas estruturais, como a GFAP (Casella et al.,

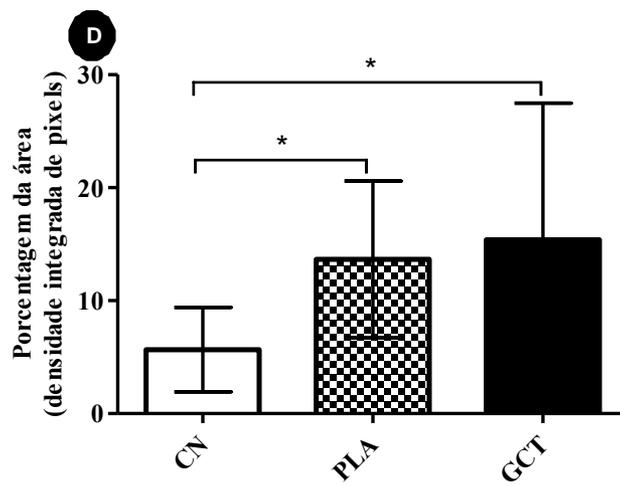
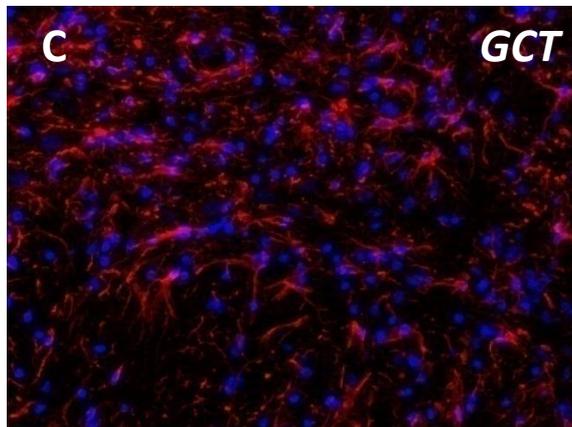
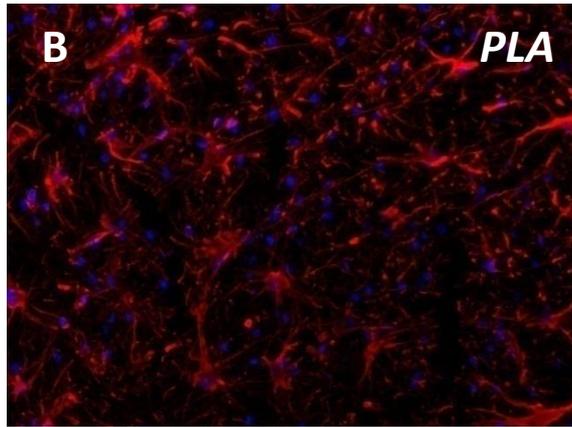
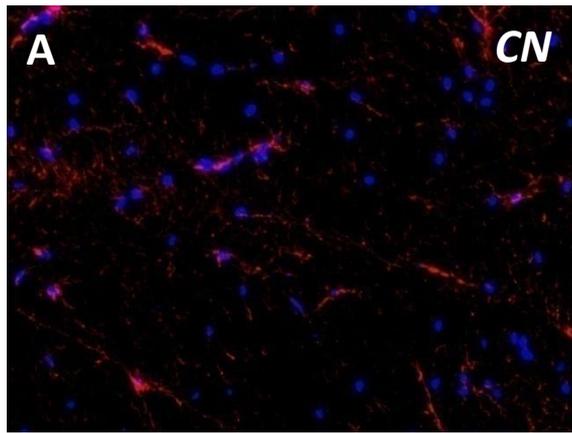
2004).

No presente estudo, observou-se, na 5ª semana após a 2ª cirurgia, diferença estatística entre a intensidade da imunomarcagem da GFAP no grupo *CN*, em relação aos grupos com lesão *PLA* e *GCT* ($p < 0,05$) (Fig. 9D). O trauma medular determinou aumento da reação glial (Fig. 9B-C), corroborando com os achados verificados ao exame histológico da ME, que apresentaram na área de mielomalácia, proliferação celular semelhante entre os grupos com trauma, sendo composta

principalmente por células da glia e de Gitter (Fig. 6L-M). Outros estudos com CTM no trauma medular também não demonstraram agravamento da gliose reativa, o que reforça a segurança deste tipo de intervenção terapêutica (Hofstetter et al. 2002; Ankeny et al., 2004; Ohta et al., 2004). Como observado, os animais com trauma apresentaram, independente do grupo, aumento da produção de GFAP e, por este motivo, o emprego de substâncias

ou enzimas, como a condroitinase ABC, capazes de interferir na formação das moléculas geradas pelos astrócitos reativos, poderia trazer resultados benéficos. Neste caso, a combinação de terapias poderia ser também interessante, já que a presença da astrogliose contribui para a falência da regeneração axonal como demonstrado por McGraw et al. (2001); Yiu e He (2006) e Busch e Silver (2007).

Figura 9. Fotomicrografias de secções transversais da medula espinal de ratos Lewis, submetidas à imunofluorescência com anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP), na 5ª semana pós-inoculação. A) Imunomarcção anti-GFAP (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI), no funículo dorsal da substância branca, animal pertencente ao grupo controle negativo (CN). B) Imunomarcção anti-GFAP (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI), no funículo dorsal da substância branca, animal submetido a trauma medular e inoculado com veículo (PLA). Observar a maior intensidade da imunomarcção, em relação ao CN. C) Imunomarcção anti-GFAP (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI), no funículo dorsal da substância branca, animal submetido a trauma medular e inoculado com células tronco mesenquimais (GCT). Observar a maior intensidade da imunomarcção em vermelho, em relação ao CN, confirmada pela análise quantitativa representada no gráfico D. D) Análise quantitativa da porcentagem da densidade integrada de pixels na área da fração para a GFAP na substância branca, valores expressos em médias e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). (200x).

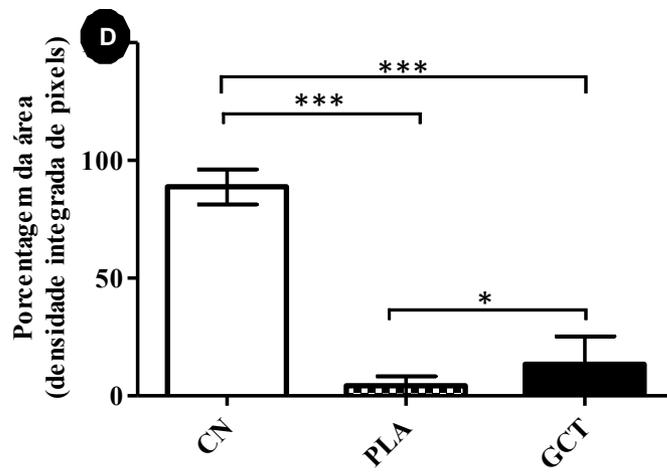
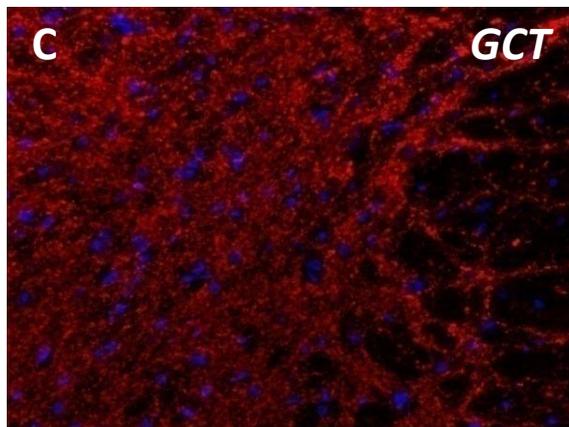
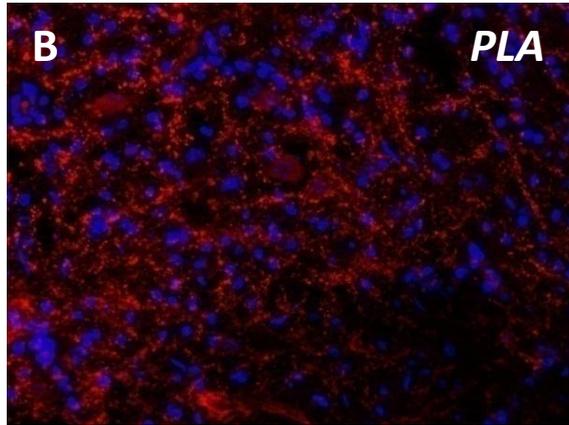
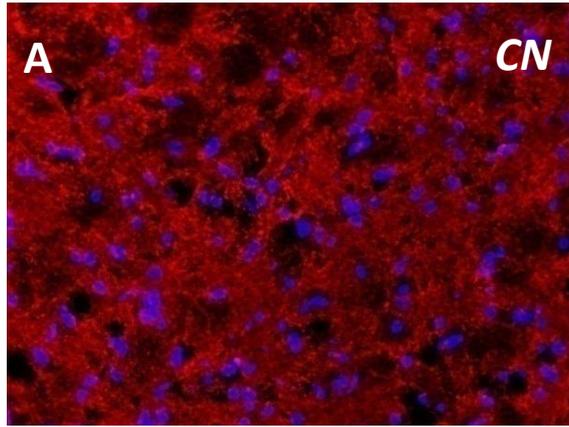


Paralelamente, foi avaliada a imunorreatividade da sinaptofisina na substância cinzenta da região do epicentro da lesão medular. A sinaptofisina é a maior proteína transmembrana presente em vesículas sinápticas, com função central na neurotransmissão dos terminais pré-sinápticos. Vários estudos demonstraram que a sinaptofisina regula a endo e exocitose de neurotransmissores (Sugita et al., 1999; Valtorta et al., 2004), bem como participa na formação e na renovação de vesículas sinápticas (Daly et al., 2000; Thiele et al., 2000). Foi verificada que a diminuição desta proteína correlaciona-se com a intensidade e a progressão de diversas disfunções do sistema nervoso, incluindo doença de Alzheimer e avulsão de raiz ventral (Ingelsson et al., 2004; Rodrigues Hell et al., 2009). Contudo, em estudo com trauma crânio-encefálico, houve aumento da imunorreatividade para a sinaptofisina, devido tanto à inibição do transporte vesicular quanto a disfunções sinápticas (Shojo e Kibayashi, 2004). Assim parece que ocorre comportamento variável da sinaptofisina, dependendo do tipo e local da afecção neurológica e do modelo experimental adotado. Em relação a traumas medulares associados ao tratamento com CTM, são escassas as inferências sobre o comportamento da sinaptofisina, sendo deste modo interessante avaliá-la como indicador da plasticidade sináptica.

No presente estudo, foi observada, na 5ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM, diferença entre a intensidade da imunomarcagem da sinaptofisina entre os grupos com trauma (*PLA* e *GCT*) ($p < 0,05$) e o controle negativo (*CN*) ($p < 0,05$) (Fig.

14D). Neste grupo verificou-se intensa marcação na substância cinzenta (Fig. 10A), isto devido ao número de sinapses ativas. Em contrapartida, a lesão medular ocasionou redução de até 87,2% na imunorreatividade da proteína vesicular (Fig. 10B-C), sendo este resultado possivelmente justificado com base na perda acentuada de neurônios, fato já descrito. Interessante foi que, apesar de ter ocorrido redução na imunomarcagem da sinaptofisina nos animais com trauma, o grupo inoculado com CTM apresentou maior preservação da sinaptofisina (Fig. 10D). Muito embora não tenha ocorrido diferença na contagem de neurônios entre os grupos com trauma (Fig. 7J-L), percebeu-se que houve ação benéfica das CTM nos neurônios remanescentes do grupo *GCT*, ocorrendo preservação de uma importante proteína vesicular. Isto sugere que as CTM possam ter favorecido a neuroplasticidade, corroborando com o achado de Rodrigues Hell et al., (2009), que verificaram maior imunorreatividade para a sinaptofisina, decorrente do tratamento com CTM em ratos submetidos à avulsão de raiz nervosa. Foi sugerido, por estes autores, que a liberação dos fatores neurotróficos, incluindo o BDNF e o derivado da glia (GDNF) pelas CTM, possa ter influenciado positivamente a plasticidade sináptica. No presente estudo, foram quantificadas na medula espinal as expressões dos mRNA das neurotrofinas BDNF e NT-3, bem como de fatores associados a apoptose, a fim de verificar se houve, a partir da inoculação de CTM, maior síntese destas proteínas que pudessem determinar a maior densidade da sinaptofisina no grupo *GCT*.

Figura 10. Fotomicrografias de secções transversais da medula espinal de ratos Lewis, submetidas à imunofluorescência com anti-sinaptofisina, na 5ª semana pós-inoculação (correspondente ao 49º dia após a primeira cirurgia). A) Imunomarcção anti-sinaptofisina (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI) no funículo dorsal da substância branca, animal pertencente ao grupo controle negativo (*CN*). B) Imunomarcção anti-sinaptofisina (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI) presente no funículo dorsal da substância branca, animal submetido a trauma medular e inoculado com veículo (*PLA*). Observar a menor intensidade da imunomarcção, em relação ao *CN*. C) Imunomarcção anti-sinaptofisina (em vermelho) e núcleos de células (em azul pelo DAPI) presente no funículo dorsal da substância branca, animal submetido a trauma medular e inoculado com células tronco mesenquimais (*GCT*). Observar a menor intensidade da imunomarcção, em relação ao *CN*, confirmada pela análise quantitativa representada no gráfico D. D) Análise quantitativa da porcentagem da densidade integrada de pixels na área da fração presente para a sinaptofisina na substância cinzenta, valores expressos em média e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa (***) = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$). (200x).



5.5. Mensuração por PCR em tempo real da expressão dos mRNAs das neurotrofinas BDNF e Neurotrofina – 3

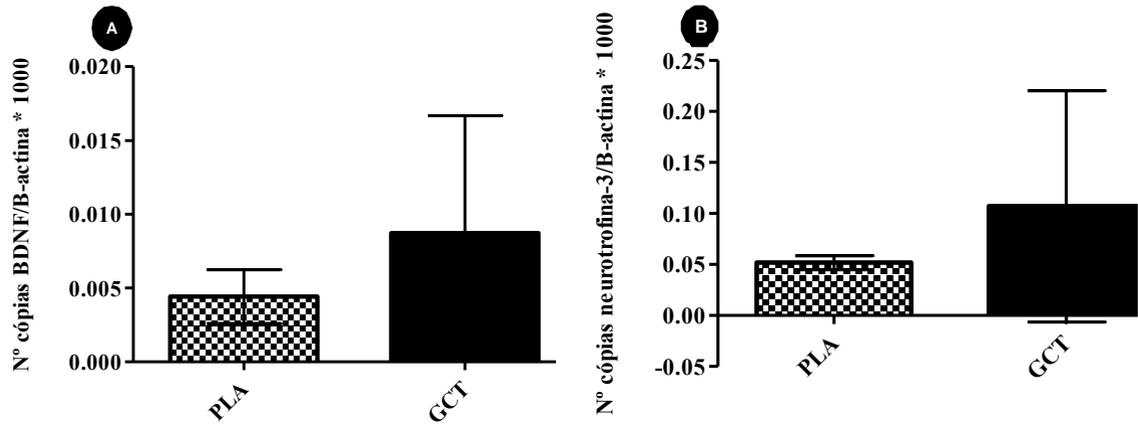
Com relação à expressão gênica das neurotrofinas BDNF e NT-3, não houve diferença estatística no número de cópias dos seus mRNAs entre os grupos com trauma *PLA* e *GCT*, na 2ª e 3ª semana após a inoculação do veículo ou das CTM ($p > 0,05$) (Fig. 11A-B-C-D). Ao se observar o comportamento do grupo *GCT*, ocorreu maior amplitude de variação dos resultados, havendo expressão máxima duas a quatro vezes dessas neurotrofinas, em comparação ao grupo *PLA*. Resultado semelhante foi identificado por Kim et al. (2009), que observaram maior expressão do mRNA do BDNF e da NT-3 nos animais inoculados com CTM, apesar da ausência de diferença entre grupos com trauma.

Na comparação dos grupos *PLA* e *GCT* em relação ao controle negativo (*CN*), houve, na 5ª semana após o transplante, diferença na quantificação relativa da NT-3 ($p < 0,05$) (Fig. 11F). Independente do grupo com trauma *PLA* e *GCT*, as concentrações do BDNF e da NT-3 apresentavam-se mais próximas entre si nesta avaliação.

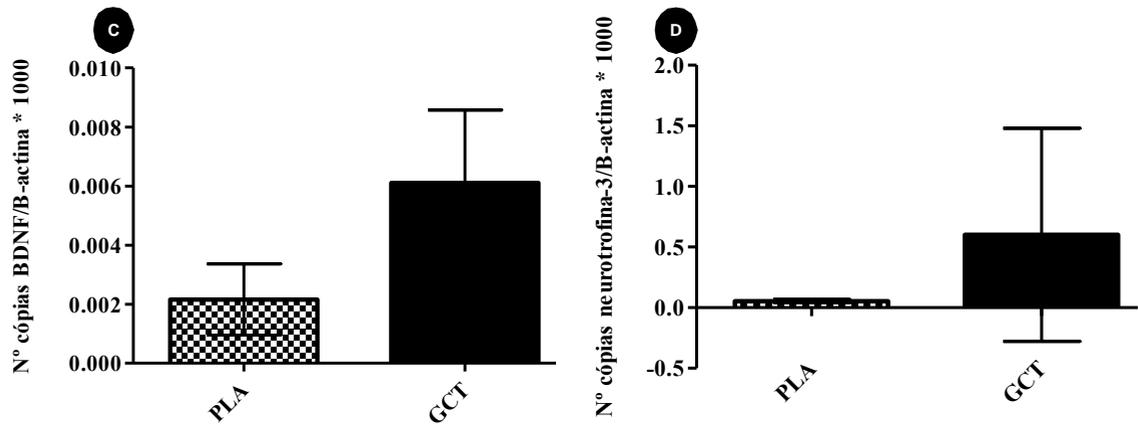
Em contra partida, há relatos em que ocorreu aumento significativo destas e de outras neurotrofinas, decorrente do efeito benéfico das CTM (Chen et al., 2008; Rodrigues Hell et al., 2009). As diferenças de resposta podem estar relacionadas ao tipo de trauma no sistema nervoso, ao número de células injetadas e ao tempo de avaliação pós-inoculação. No presente estudo, as expressões do BDNF e da NT-3 foram avaliadas na 2ª, 3ª e 5ª semanas após a inoculação do veículo ou das CTM, sendo que nesse período inicial também se observou recuperação funcional mais precoce nos animais do grupo *GCT*. Este resultado pode ter sido influenciado pela regulação mais expressiva dos receptores tirosina cinase TrkB e C, em que se ligam as moléculas de BDNF e NT-3, respectivamente. No presente estudo, não se quantificou a expressão deste receptor, mas de qualquer modo, a maior integração das neurotrofinas aos seus receptores, isto por ação das CTM, poderia acarretar na preservação da sinaptofisina. Como mencionado por Lonze e Ginty (2002), Chao (2003) e Carvalho et al. (2008), o funcionamento de neurônios e de células da glia é afetado pela ação das neurotrofinas, com o favorecimento da plasticidade do SNC, dentre outras atividades.

Figura 11. Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e da neurotrofina – 3 (NT-3) (normalizada em relação ao gene constitutivo B-actina) no segmento medular de ratos Lewis submetidos à laminectomia (*CN*, n = 4) ou ao trauma medular (inoculados com veículo - *PLA*, n = 4; inoculados com células tronco mesenquimais – *GCT*, n = 4). A) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do BDNF, realizada na 2ª semana pós-inoculação. B) Quantificação absoluta da expressão do mRNA da NT-3, realizada na 2ª semana pós-inoculação. C) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do BDNF, realizada na 3ª semana pós-inoculação. D) Quantificação absoluta da expressão do mRNA da NT-3, realizada na 3ª semana pós-inoculação. E) Quantificação relativa da expressão do mRNA do BDNF, realizada na 5ª semana pós-inoculação. F) Quantificação relativa da expressão do mRNA da NT-3, realizada na 5ª semana pós-inoculação. Valores expressos em médias e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$).

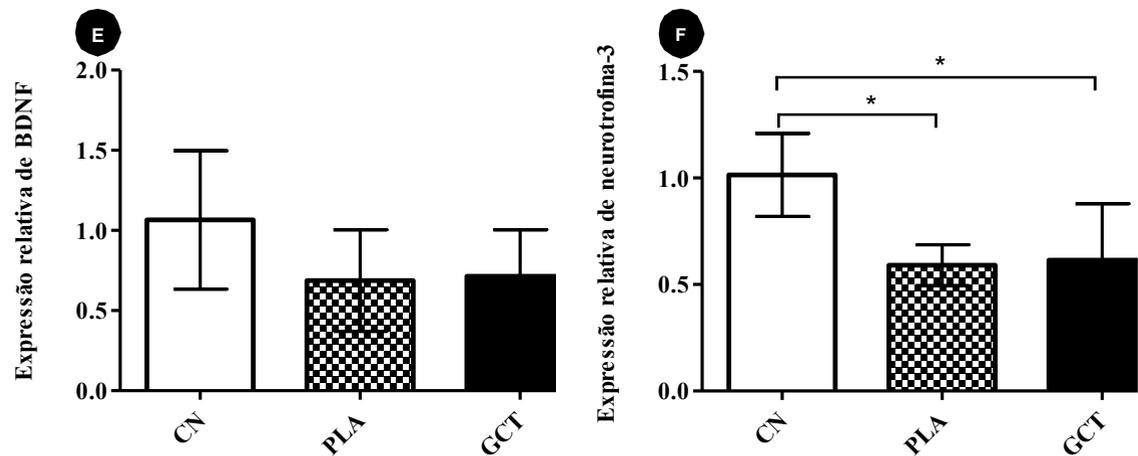
2ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM



3ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM



5ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM



Paralelamente, foi também sugerido que os efeitos benéficos do tratamento com CTM poderiam estar associados à secreção de outras substâncias, como o fator estimulante de colônia - 1, as interleucinas, os fatores das células tronco e o fator de crescimento fibroblástico básico (Chen et al., 2008). Em conjunto, estas substâncias poderiam exercer ação neuroprotetora complexa na medula espinal lesionada, incluindo a redução da apoptose. Possivelmente, em populações celulares não neuronais, presentes no tecido nervoso, já que como constatado no presente estudo a contagem neuronal não foi maior no grupo *GCT*. Assim, na tentativa de elucidar outros mecanismos associados à ação das CTM, procurou-se avaliá-las também na apoptose.

5.6. Identificação de células em apoptose pela técnica do TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase – TdT dUTP nick end labeling*)

Ao exame microscópico das medulas espinhais do grupo *CN*, coradas pela técnica de TUNEL, verificaram-se, na 5ª semana após a 2ª cirurgia, neurônios e células da glia com coloração azul esverdeada, sendo raras as células TUNEL positivas de coloração marrom, localizadas apenas na substância branca. Nos grupos com trauma medular, os corpos apoptóticos também de marcação marrom, estavam distribuídos em ambas as substâncias, sendo mais frequentes na branca.

No grupo *GCT* houve menor número de células positivas se comparado ao *PLA*. Em relação a esta variável, foram observadas as médias e os desvios-padrão de $0,07 \pm 0,03$; $1,20 \pm 0,43$ e $0,53 \pm 0,29$, respectivamente para os grupos *CN*, *PLA* e *GCT* (Fig. 16). A diferença significativa na contagem dos corpos apoptóticos entre os grupos com trauma ($p < 0,05$) foi marcante, destacando-se ainda que o inoculado com CTM (*GCT*) foi semelhante ao *CN* ($p > 0,05$).

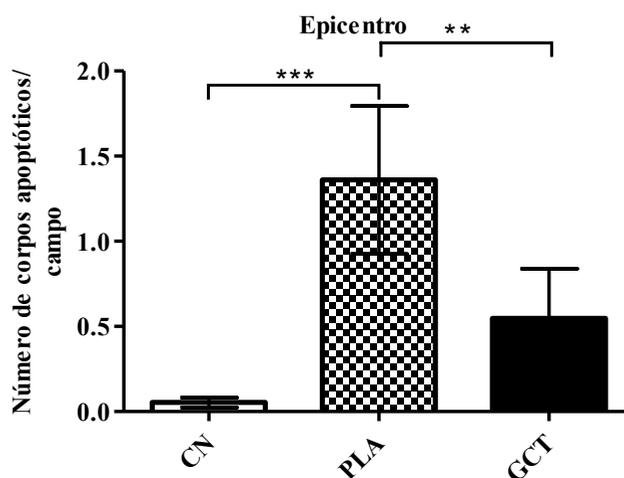


Figura 12. Gráfico das médias e desvios-padrão do número de corpos apoptóticos presentes na medula espinal de ratos Lewis, na região da laminectomia (controle negativo - *CN*) ou do trauma medular (inoculados com veículo - *PLA* ou inoculados com células tronco mesenquimais - *GCT*) e, submetidas à técnica do TUNEL, na 5ª semana pós-inoculação. Asterisco indica diferença significativa (***) = $p < 0,001$; ** = $p < 0,003$).

O trauma da ME promove a necrose celular no epicentro, mas são os eventos secundários que determinam a propagação da lesão tissular, com a perda progressiva dos elementos celulares principalmente por apoptose. Este processo é ativo e culmina com a completa destruição da célula, sendo, para tanto, necessárias a transcrição de DNA e a síntese protéica. Alterações morfológicas bem definidas são observadas e, ao contrário da necrose, não é desencadeada a ativação do sistema imunológico. Estudo com TME demonstrou que a apoptose ocorreu em picos principais, incluindo as primeiras quatro e 24 horas e ainda no 7º dia após a lesão medular (Lu et al., 2000). No presente trabalho, verificou-se pela técnica de TUNEL que este evento esteve também presente na 7ª semana pós-trauma (5ª semana após o transplante de veículo ou de CTM) e deste modo deve ter contribuído para as conseqüências funcionais da lesão medular, caracterizadas

pelo pior desempenho locomotor.

Outro aspecto que merece atenção é a maior distribuição de células TUNEL positivas na substância branca da ME dos ratos submetidos ao trauma medular. Nesta região encontram-se vasos e células da glia, principalmente oligodendrócitos que, ao sofrerem apoptose, geram a desmielinização e o comprometimento de axônios. A morte tardia destas células vem sendo atribuída a um suporte trófico inadequado (Barres et al., 1993), à presença de citocinas inflamatórias (Silver e Miller, 2004; Li et al., 2005a) e ao maior estímulo de receptores $p75^{\text{NTR}}$ pelas pró-neurotrofinas (Beattie et al., 2002; Hajebrahimi et al., 2008). Paralelamente, vários são os relatos relacionados aos efeitos benéficos das CTM na preservação da mielina na substância branca e na orientação do crescimento axonal (Ankeny et al., 2004; Himes et al., 2006), bem como no menor número de células em apoptose

(Dasari et al., 2007). Com base nos achados do presente estudo, pode-se também verificar que as CTM interferiram favoravelmente nesse processo, determinando assim menor número de células em apoptose. Assim, o efeito terapêutico das CTM pode estar relacionado, não somente a maior conservação da sinaptofisina como anteriormente discutido, mas também à preservação de células como os oligodendrócitos, que em conjunto refletiram na melhora clínica mais precoce do grupo *GCT*.

Paralelamente foi empregada a mensuração de mRNAs associados a apoptose por RT-PCR em tempo real, já que a técnica de TUNEL isolada não é considerada indicadora específica de apoptose.

5.7. Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs do Bcl-x_L, Bax e caspase-9

Foram avaliadas as expressões dos genes associados a apoptose, incluindo o fator anti-apoptótico Bcl-x_L e os pró-apoptóticos Bax e caspase-9. As proteínas Bcl-x_L e Bax estão presentes na membrana mitocondrial e fazem parte da família das proteínas Bcl, que também é constituída por outros membros anti (Bcl-2) e pró-apoptóticos (Bad, Bak, Bcl-x_s). A forma Bcl-x_L está presente em neurônios e quando é super expressa, contribui para a regulação da sobrevivência celular, diminuindo a apoptose. Este efeito ocorre por meio do controle da permeabilidade mitocondrial aos íons e da menor liberação do citocromo C para o citoplasma (Minn et al., 1997). De acordo com Qiu et al. (2001), a apoptose decorrente do trauma medular correlaciona-se com a diminuição na concentração da proteína Bcl-x_L e na menor proporção entre Bcl-x_L/Bax no local da injúria.

No presente estudo, não houve diferença na

expressão do mRNA da Bcl-x_L entre os grupos com trauma na 2^a e 3^a semanas após a inoculação do veículo ou das CTM ($p > 0,05$) (Fig. 13A-C). Para esta variável, foi também observada maior expressão no *GCT*, a exemplo do verificado para as neurotrofinas BDNF e NT-3. Neste grupo, o número máximo de cópias formado em relação à beta-actina foi de 113,47 para Bcl-x_L na 2^a semana após o transplante, período que corresponde ao 28^o de lesão à medula espinal (Fig. 13A). Na avaliação seguinte, os valores médios e os desvios-padrão para o Bcl-x_L foram $30,41 \pm 5,86$ (*PLA*) e $33,27 \pm 5,74$ (*GCT*) (Fig. 13C), enquanto que na 5^a semana houve diferença entre os grupos com trauma, em relação ao controle negativo (*CN*) ($p < 0,05$) (Fig. 13E). Percebe-se que a expressão deste fator anti-apoptótico foi reduzida nos grupos submetidos à lesão medular, possivelmente por ação das alterações decorrentes do TME.

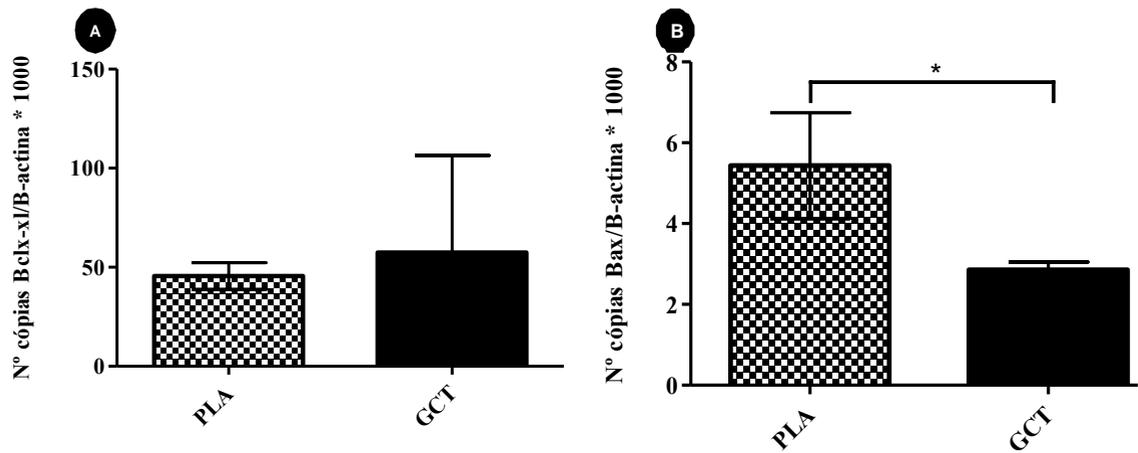
Em relação à expressão do Bax, foi possível observar diferença estatística entre os grupos com trauma na 2^a semana após o transplante celular, sendo que no inoculado com CTM houve número significativamente menor de cópias para este parâmetro ($p < 0,05$) (Fig. 13B). Na quantificação de Bax na 3^a e 5^a semanas, não houve diferença entre estes grupos ($p < 0,05$) (Fig. 13D-F), contudo a expressão relativa do Bax na última mensuração foi mais que o dobro no grupo inoculado com o veículo, em relação aquele que recebeu as CTM. A inoculação intralésional de CTM no 14^o dia pós-trauma interferiu favoravelmente neste processo, ao diminuir a expressão do Bax e ao aumentar a do Bcl-x_L no grupo *GCT*. O efeito anti-apoptótico das CTM foi também demonstrado pelo menor número de corpos apoptóticos identificados pela técnica de TUNEL, dado apresentado anteriormente. A contagem dessas células foi realizada na 5^a semana após o transplante celular, assim como as demais avaliações histológicas e, caso

tivesse sido também realizada na 2ª semana, possivelmente indicaria número de corpos apoptóticos ainda maior no grupo *PLA*, em relação ao *GCT*. De qualquer modo, o transplante celular determinou menor

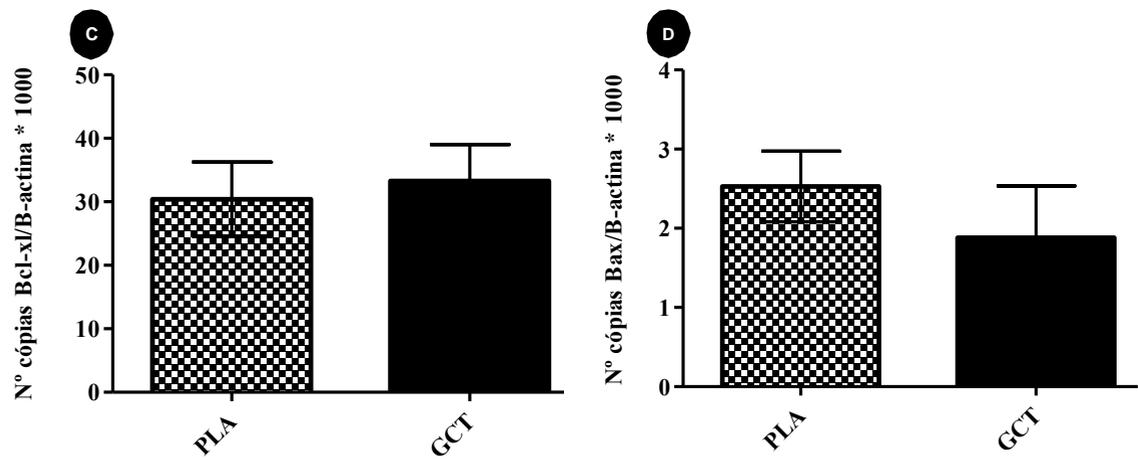
expressão de Bax e assim deve ter ocorrido menor ativação da cascata proteolítica, iniciada pela caspase-9, como descrito por Keane et al. (2001).

Figura 13. Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs do Bcl-x_L e do Bax (normalizada em relação ao gene constitutivo B-actina) no segmento medular de ratos Lewis submetidos à laminectomia (CN, n = 4) ou ao trauma medular (inoculados com veículo - PLA, n = 4; inoculados com células tronco mesenquimais - GCT, n = 4). A) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do Bcl- x_L, realizada na 2^a semana pós-inoculação. B) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do Bax, realizada na 2^a semana pós-inoculação. C) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do Bcl- x_L, realizada na 3^a semana pós-inoculação. D) Quantificação absoluta da expressão do mRNA do Bax, realizada na 3^a semana pós-inoculação. E) Quantificação relativa da expressão do mRNA do Bcl- x_L, realizada na 5^a semana pós-inoculação. F) Quantificação relativa da expressão do mRNA do Bax, realizada na 5^a semana pós-inoculação. Valores expressos em médias e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa (** = p<0,003; * = p<0,05).

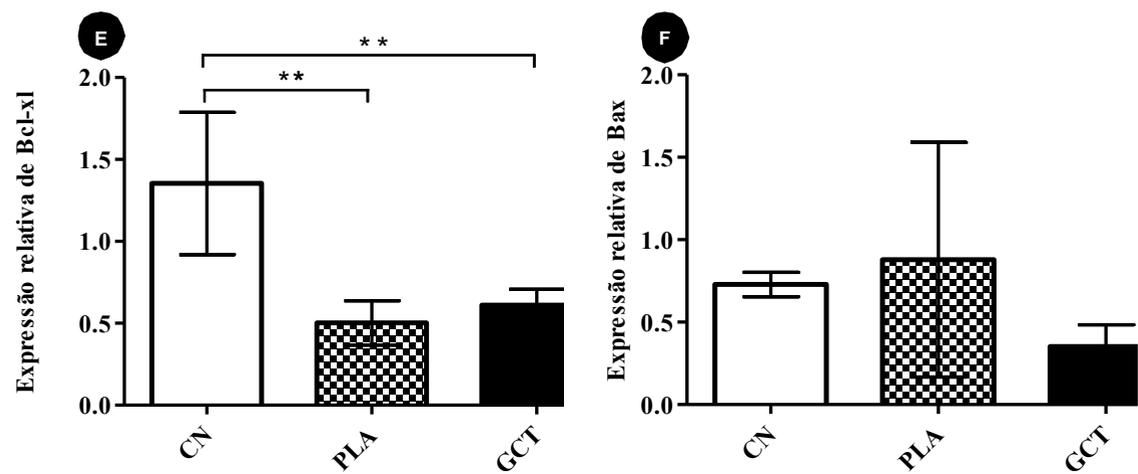
2ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM



3ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM



5ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM



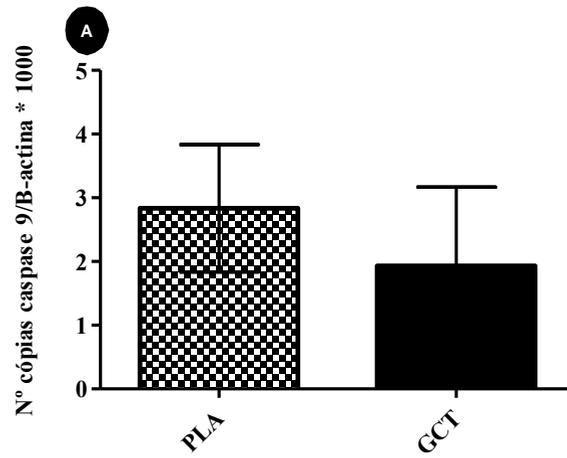
Na avaliação da apoptose por meio da quantificação do mRNA da caspase-9, não houve, na 2ª semana após a inoculação de veículo ou de CTM, diferença entre os grupos com trauma ($p>0,05$) (Fig. 14A). Nesta avaliação, foi observada uma menor expressão no grupo *GCT*, contudo não significativa, já em relação à 3ª semana, houve diferença estatística no número de cópias para a caspase-9 ($p<0,05$), sendo maior a expressão no grupo *PLA* (Fig. 14B). A caspase-9, uma enzima pertencente à família das cisteínas proteases, apresenta-se de forma constitutiva e inativada nas células e a partir de vários estímulos apoptóticos ocorre modificação desta proteína. Dentre estes, destaca-se a extrusão do citocromo c para o citoplasma e a ativação do fator protease ativador da apoptose, ambos desencadeados pela maior expressão de Bax (Shimizu et al., 2000). Com isso, a caspase-9 sofre autocatálise, tornando-se ativa e, então é iniciada uma cascata proteolítica com ativação de caspases executoras, o que culmina com a

morte celular programada (Yakovlev e Faden, 2001).

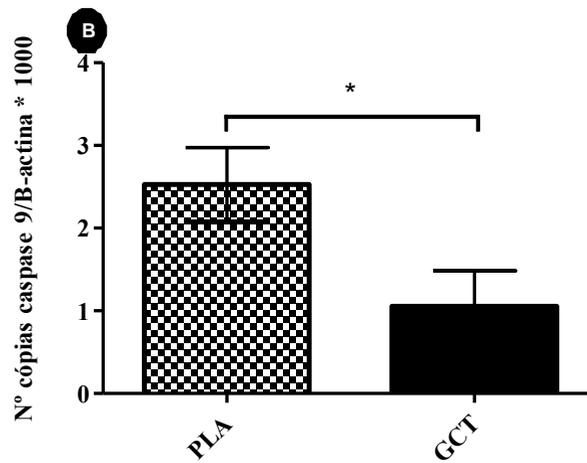
Na 5ª semana após a inoculação, a expressão de caspase-9 tornou-se semelhante entre os grupos com trauma ($p>0,05$) e diferente de *CN* ($p<0,05$) (Fig. 14C). Neste período, o maior número de células TUNEL-positivas pode ter sido desencadeado por mecanismos apoptóticos independentes da via mitocondrial, já que não houve diferença na expressão de caspase-9 entre os grupos *PLA* e *GCT* (Fig. 14C). A fragmentação do DNA, verificada pela técnica de TUNEL, pode ter ocorrido pela via extrínseca da apoptose, em que ocorre a sinalização de receptores transmembrana por moléculas extracelulares, como o TNF. Em seguida a este acoplamento, ocorre a ativação da caspase-8 e a formação de um complexo sinalizador da indução de morte, com a ativação de outras caspases e a clivagem de proteínas intracelulares estruturais e, finalmente, a apoptose (Majno e Joris, 1995).

Figura 14. Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão do mRNA da caspase-9 (normalizada em relação ao gene constitutivo B-actina) no segmento medular de ratos Lewis submetidos à laminectomia (*CN*, n = 4) ou ao trauma medular (inoculados com veículo - *PLA*, n = 4; inoculados com células tronco mesenquimais - *GCT*, n = 4). A) Quantificação absoluta da expressão do mRNA da caspase-9, realizada na 2ª semana pós-inoculação. B) Quantificação absoluta da expressão do mRNA da caspase-9, realizada na 3ª semana pós-inoculação. C) Quantificação relativa da expressão do mRNA da caspase-9, realizada na 5ª semana pós-inoculação. Valores expressos em médias e desvios-padrão. Asterisco indica diferença significativa (** = p<0,003; * = p<0,05).

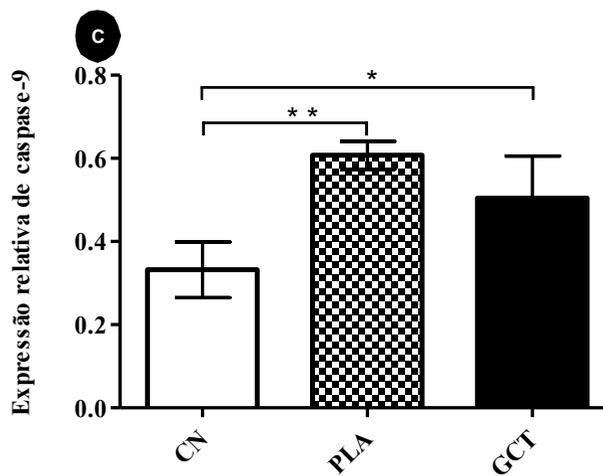
2ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM



3ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM



5ª semana pós-inoculação de veículo ou de CTM



Paralelamente, Kim et al. (2009) demonstraram, em um estudo com trauma encefálico em ratos, efeito terapêutico das CTM pela menor expressão de fatores associados à apoptose, mas neste relato a inoculação celular ocorreu 24 horas após a lesão. Em relação ao trauma medular propriamente dito, são escassas as inferências sobre o comportamento das

CTM administradas tardiamente e com efeito sobre os mecanismos de apoptose. Assim com base nos resultados, sugere-se que o transplante de CTM agiu de forma promissora no tratamento subcrônico do trauma medular, ao interferir favoravelmente na apoptose do tecido neuronal.

6. CONCLUSÕES

- i) A administração intralésional de CTM indiferenciadas em ratos com trauma medular grave demonstrou ser um tratamento eficaz ao promover recuperação neurológica mais precoce.
- ii) As CTM não intensificaram a formação da cicatriz glial e paralelamente favoreceram a maior preservação da sinaptofisina no epicentro do trauma medular.
- iii) O transplante tardio de CTM reduziu a apoptose decorrente do TME, pela redução nas expressões de Bax e de caspase-9.

7. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

ALISON, M.; SARRAF, C. Hepatic stem cells. *J. Hepatol.*, v.29, p.678–683, 1998.

ALLEN, S.J.; DAWBARN, D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin. Sci.*, p.175-191, 2006.

ANKENY, D.P.; TIGUE, D.M. Mc.; 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.

APOSTOLOVA, I.; IRINTCHEV, A.; SCHACHNER, M. Tenascin-R restricts posttraumatic remodeling of motoneuron innervation and functional recovery after spinal cord injury in adult mice. *J. Neurosci.*, v.26, p.7849–7859, 2006.

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, v.34, p.325-337, 2003.

ASHER, R.A.; MORGENSTERN, D.A.; FIDLER, P.S. et al. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J. Neurosci.*, v.20, p.2427-2438, 2000.

AZIZI, S.A.; STOKES, D.; AUGELLI, B.J. et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—

similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 95, p.3908–3913, 1998.

BAKSHI, A.; BARSHINGER, A.L.; SWANGER, S.A. et al. Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation. *J. Neurotrauma*, v.23, p.55–65, 2006.

BALANTINE, J.D. Pathology of experimental spinal cord trauma. *Lab. Invest.*, v.39, p.236-253, 1978.

BAREYRE, F.M.; SCHWAB, M.E. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci.*, v.26, p.555–563, 2003.

BAREYRE, F.M.; KERSCHENSTEINER, M.; RAINETEAU, O. et al. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat. Neurosci.*, v.7, p.269–77, 2004.

BARRES, B.A.; JACOBSON, M.D.; SCHMID, R. et al. Does oligodendrocyte survival depend on axons? *Curr. Biol*, v.3, p.489–497, 1993.

BARRY, F.P.; MURPHY J.M. Mesenchymal stem cell: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, v.36, p.568-584, 2004.

BASSO, D.M. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities,

- complexities, and controversies. *J. Neurotrauma*, v.21, p.395–404, 2004.
- BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma*, v.12, p.1–21, 1995.
- BASSO, D.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.
- BEATTIE, M.S. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *Trends Mol. Med.*, v.10, p.580-583, 2004.
- BEATTIE, M.S.; HARRINGTON, A.W.; LEE, R. et al. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*, v.36, p.375–386, 2002.
- BEHRMANN, D.L.; BRESNAHAN, J.C.; BEATTIE, M.S. et al. Spinal cord injury produced by consistent displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J. Neurotrauma*, v.9, p.197–217, 1992.
- BOHLMAN, H.H.; BAHNIUK, E.; FIELD, G. et al. Spinal cord monitoring of experimental incomplete cervical spinal cord injury: a preliminary report. *Spine*, v.6, p.428–436, 1981.
- BROTON, J.G.; NIKOLIC, Z.; SUYS, S. et al. Kinematic analysis of limb position during quadrupedal locomotion in rats. *J. Neurotrauma*, v.13, p.409–416, 1996.
- BRÜSTLE, O.; JONES, K.N.; LEARISH, R.D. et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, v.30, p.754-756, 1999.
- BUNDESEN, L.Q.; SCHEEL, T.A.; BREGMAN, B.S. et al. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte–meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J. Neurosci.*, v.23, p.7789–7800, 2003.
- BUSCH, S.A.; SILVER, J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v.17, p.120–127, 2007.
- BYRAVAN, S.; FOSTER, L. M.; PHAN, T. et al. Murine oligodendroglial cells express nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.91, p.8812–8816, 1994.
- CARVALHO, A.L.; CALDEIRA, M.V.; SANTOS, S.D. et al. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br. J. Pharmacol.*, v.153, p.S310-S324, 2008.
- CASELLA, G.T.B.; BUNGE, M.B.; WOOD, P.M. Improved immunocytochemical identification of neural, endothelial, and inflammatory cell types in paraffin-embedded injured adult rat spinal cord. *J. Neurosci. Methods*, v.139, p.1-11, 2004.
- CASTRO, R. JR.; HUGHES, M.G.; XU, G.Y.; CLIFTON, C.; CALINGASAN, N.Y.; GELMAN, B.B.; MCADOO, D.J. Evidence that infiltrating neutrophils do not release reactive oxygen species in the site of

spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.190, p. 414–424, 2004.

CAYLI, S.R.; KOCAK, A.; YILMAZ, U. et al. Effect of combined treatment with melatonin and methylprednisolone on neurological recovery after experimental spinal cord injury. *Eur. Spine J.*, v.13, p.724–732, 2004.

CHAO, M.V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.4, p.299-309, 2003.

CHEN, J.; CHENG, G.; SHEU, C. et al. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke. *J. Anat.*, v.213, p.249–258, 2008.

CHIANG, C.S.; STALDER, A.; SAMIMI, A. et al. Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Dev. Neurosci.*, v.16, p.212–221, 1994.

COLTER, S.; RUCKER, N.C. Acute injury to the central nervous system. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.18, p.545-563, 1988.

DALY, C.; SUGIMORI, M.; MOREIRA, J.E. et al. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.97, p.6120-6125, 2000.

DASARI, V.R.; SPOMAR, D.G.; CADY, C. et al. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow down regulate Caspase-3 mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats.

Neurochem. Res., v.32, p.2080-2093, 2007.

DAWBARN, D.; ALLEN, S. J. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, v.29, p.211–230, 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.

DUCKER, T.B.; SALCMAN, M.; PEROT, P.L. et al. Experimental spine cord trauma. I. Correlation of blood flow, tissue oxygen, neurologic status in the dog. *Surg. Neurol.*, v.10, p.60-63, 1978.

DUNNING, M.D.; KETTUNEN, M.; FFRENCH-CONSTANT, C. et al. Magnetic resonance imaging of functional Schwann cell transplants labeled with magnetic microspheres. *Neuroimage*, v.31, p.172-180, 2006.

ELKABES, S.; DICICCO-BLOOM, E.M.; BLACK, I.B. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.*, v.16, p. 2508–2521, 1996.

EMERY, E.; ALDANA, P.; BUNGE, M.B. et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v.89, p.911–920, 1998.

FAULKNER, J.R.; HERRMANN, J.E.; WOO, M.J. et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v.24, p.2143–2155, 2004.

- FEHLINGS, M.G.; TATOR, C.H. The relationship among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.132, p.220–228, 1995.
- FISCHER, I. Candidate cells for transplantation into the injured CNS. *Prog. Brain Res.*, v.128, p.253-257, 2000.
- FITCH, M.T.; SILVER, J. Activated macrophages and the blood–brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Exp. Neurol.*, v.148, p.587–603, 1997.
- FRIEDENSTEIN, A.J.; GORSKAJA, J.F.; KULAGINA, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.*, v.4, p.267-274, 1976.
- GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. *Science*, v.287, p.1433–1438, 2000.
- GALE, K.; KERASIDIS, H.; WRATHALL, J.R. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp. Neurol.*, v.88, p.123–134, 1985.
- GAVIRIA M.; PRIVAT, A.; D'ARBIGNY, P. et al. Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Res.*, v.874, p.200-209, 2000.
- GIGLIO, C.A.; DEFINO, H.L.; DA-SILVA, C.A. et al. Behavioral and physiological methods for early quantitative assessment of spinal cord injury and prognosis in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.39, p.1613–1623, 2006.
- GIULIAN, D.; LACHMAN, L.B. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science*, v.228, p.497–499, 1985.
- GUIZAR-SAHAGUN, G.; GRIJALVA, I.; SALGADO-CEBALLOS, H. et al. Spontaneous and induced aberrant sprouting at the site of injury is irrelevant to motor function outcome in rats with spinal cord injury. *Brain Res.*, v.1013, p.143–151, 2004.
- HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v.23, p.263-280, 2006.
- HAJEBRAHIMI, Z.; MOWLA, S.J.; MOVAHEDIN, M. et al. Gene expression alterations of neurotrophins, their receptors and prohormone convertases in a rat model of spinal cord contusion. *Neurosci. Lett.*, v. 441, p.261-266, 2008.
- HALL, E.D. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J. Neurosurg.*, v.73, p.13-22, 1992.
- HAMERS, F.P.T.; LANKHORST, A.J.; LAAR, T.J.V. et al. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J. Neurotrauma*, v.18, p.187-201, 2001.
- HARGREAVES, K.; DUBNER, R., BROWN, F. et al. A new and sensitive method for measuring thermal

- nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, v.32, p.77–88, 1988.
- HEMPSTEAD, B. The many faces of p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v.12, p.260–267, 2002.
- HIMES, B.T.; NEUHUBER, B.; COLEMAN, C. et al. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil. Neural Repair*, v.20, p.278-296, 2006.
- HOFSTETTER, C.P.; HOLMSTRÖM, N.A.V.; LILJA, J.A. et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat. Neurosci.*, v.8, p.346-353, 2005.
- HOFSTETTER, C.P.; SCHWARZ, E.J.; HESS, D. et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.99, p.2199-2204, 2002.
- HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v.7, p.393-395, 2005.
- HUANG, D.W., McKERRACHER, L., BRAUN, P.E. et al. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron*, v.24, p.639–647, 1999.
- ISHII, M.; KOIKE, C.; IGARASHI, A. et al. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.332, p. 297-303, 2005.
- INGELSSON, M., FUKUMOTO, H., NEWELL, K.L. et al. Early A β accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*, v.62, p.925–931, 2004.
- JANSSEN, L.; HANSEBOUT, R.R. Pathogenesis of spinal cord injury and newer treatment. *Spine*, v.14, p.23-32, 1987.
- JONES, L.L.; MARGOLIS, R.U.; TUSZYNSKI, M.H. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.182, p.399–411, 2003.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.
- KAKULAS, B.A. Pathology of spinal injuries. *CNS Trauma*, v.1, p.117-129, 1984.
- KARIMI-ABDOLREZAEI, S.; EFTEKHARPOUR, E.; WANG, J. et al. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v.26, p.3377-3389, 2006.
- KEANE, R.W.; KRAYDIEH, S.; LOTOCKI, G. et al. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.60, p.422-429, 2001.

- KIM, H.; LEE, J.; KIM, S. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. *J. Neurotrauma*, ahead of print, 2009.
- KOOPMANS, G.C.; DEUMENS, R.; HONIG, W.M. et al. The assessment of locomotor function in spinal cord injured rats: the importance of objective analysis of coordination. *J. Neurotrauma*, v.22, p.214–225, 2005.
- KUNKEL-BADGEN, E.; DAI, H.N.; BREGMAN, B.S. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.*, v.119, p.153–164, 1993.
- LANKHORST, A.J.; TER LAAK, M.P.; VAN LAAR, T.J. et al. Effects of enriched housing on functional recovery after spinal cord contusive injury in the adult rat. *J. Neurotrauma*, v.18, p.203–216, 2001.
- LANKHORST, A.J.; VERZIIL, M.R.; HAMERS, F.P.T. Experimental spinal cord contusion injury: comparison of different outcome parameters. *Neurosci. Res. Commun.*, v. 24, p.135–148, 1999.
- LEONARD, S.E.; REBECCA, K. The role of glutamate, calcium and magnesium in secondary brain injury. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, v.12, p.17-32, 2002.
- LEUNG, P.Y.; JOHNSON, C.S.; WRATHALL, J.R. Comparison of the effects of complete and incomplete spinal cord injury on lower urinary tract function as evaluated in unanesthetized rats. *Exp. Neurol.*, v.208, n.1, p.80-91, 2007.
- LEWIN, G.R.; BARDE, Y.A. Physiology of the neurotrophins. *Annual Rev. Neurosci.*, v.19, p.289-317, 1996.
- LI, J.; BAUD, O.; VARTANIAN, T.; VOLPE, J.J. et al. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.102, p.9936–9941, 2005a.
- LI, G.L.; BRODIN, G.; FAROOQUE, M. et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.55, n.3, p.280-289, 1996.
- LI, H.; TÉLÉMAQUE, S.; MILLER, R.E. et al. High glucose inhibits apoptosis induced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells via upregulation of Bcl-2 and Bcl-xl. *Diabetes*, v.54, p.540-545, 2005b.
- LIEBL, D.J.; HUANG, W.; YOUNG W. et al. Regulation of Trk receptors following contusion of the rat spinal cord. *Exp. Neurol.*, v.167, p.15–26, 2001.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v.25, p.402–408, 2001.
- LOHSE, D.C.; SENTER, H.J.; KAUER, I.S. Spinal cord blood flow in experimental transient paraplegia. *J. Neurosurg.*, v.52, p.335-345, 1980.

- LONZE, B.; GINTY, D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, v.35, p.605–623, 2002.
- LOY, D.N.; CRAWFORD, C.H.; DARNALL, J.B. et al. Temporal progression of angiogenesis and basal lamina deposition after contusive spinal cord injury in the adult rat. *J. Comp. Neurol.*, v.445, p.308–324, 2002.
- LU, J.; ASHWELL, K.W.S.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*, v.25, p.1859-1866, 2000.
- LU, P.; JONES, L.L.; TUSZYNSKI, M.H. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.191, p.344-360, 2004.
- LU, P.; JONES, L.L.; TUSZYNSKI, M.H. Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.203, p.8-21, 2007.
- LU, P.; YANG, H.; CULBERTSON, M. et al. Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v.26, p.11120-11130, 2006.
- LUNA, L.G. *Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258p.
- MAJDAN, M.; MILLER, F. Neuronal life and death decisions: functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v.17, p.153–161, 1999.
- MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis - An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, v.146, n.1, p.3-15, 1995.
- MARSALA, M.; YAKSH, T.Y. Transient spinal ischemia in the rat: characterization of behavioral and histopathological consequences as a function of the duration of aortic occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.14, p.526–535, 1994.
- McCONNELL, P.; BERRY, M. Regeneration of ganglion cell axons in the adult mouse retina. *Brain Res.*, v.241, p.362–365, 1982.
- McGRAW, J.; HIEBERT, G.W.; STEEVES, J.D. Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J. Neurosci. Res.*, v.63, p.109–115, 2001.
- MERKLER, D.; METZ, G.A.S.; RAINETEAU, O. et al. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J. Neurosci.*, v.21, p.3665–3673, 2001.
- METZ, G.A.S.; MERKLER, D.; DIETZ, V. et al. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.*, v.883, 165–177, 2000.
- MEYER, F.; VIALLE, L.R.; VIALLE, E.N. et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirurg. Brasil.*, v.18, n.3, p.203-208, 2003.

- MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, v.226, p.507-520, 2001.
- MINN, A.J.; VELEZ, P.; SCHENDEL, S.L. et al. Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, v.385, p.353-357, 1997.
- MITSUI, T.; FISCHER, I.; SHUMSKY, J.S. et al. Transplants of fibroblasts expressing BDNF and NT-3 promote recovery of bladder and hindlimb function following spinal contusion injury in rats. *Exp. Neurol.*, v.194, p.410-431, 2005.
- MULLEN, R.J.; BUCK, C.R.; SMITH, A.M. NeuN a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, v.116, n.1, p.201-211, 1992.
- NAGEL, S.; PAPADAKIS, M.; CHEN, R. et al. Neuroprotection by dimethylxalylglycine following permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.31, p.132-143, 2011
- OHTA, M.; SUZUKI, Y.; NODA, T. et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.*, v.187, p.266-278, 2004.
- ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.98, p.10344-103449, 2001.
- PARR, A.M.; KULBATSKI, I.; ZAHIR, T. et al. Transplanted adult spinal cord- derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. *Neuroscience*, v.155, p.760-770, 2008.
- PASTERKAMP, R.J.; ANDERSON, P.N.; VERHAAGEN, J. Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur. J. Neurosci.*, v.13, p.457-471, 2001.
- PAUL, C.; SAMDANI, A.F.; BETZ, R.R. et al. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine*, v.34, n.4, p.328-334, 2009.
- PEARSE, D.D.; LO, T.P.; CHO, K.S. et al. Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *J. Neurotrauma*, v.22, p.680-702, 2005.
- PEARSE, D.D.; SANCHEZ, A.R.; PEREIRA, F.C. et al. Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia*, v.55, p.976-1000, 2007.
- PETERSEN, B.E.; BOWEN, W.C.; PATRENE, K.D. et al. Bone marrow as a source of hepatic oval cells. *Science*, v.284, p.1168-1170, 1999.
- PITTINGER, 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.; GUAN, Z., WEI, P. et al. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.158, p.351–365, 1999.

POTTEN, C. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B: Biological Sciences*, v.353, p.821–830, 1998.

QIU, J.; NESIC, O.; YE, Z. et al. Bcl-xl expression after contusion to the rat spinal cord. *J. Neurotrauma*, v.18, p.1267-1278,2001.

RAINETEAU, O.; SCHWAB, M.E. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.2, p.263–273, 2001.

RIVLIN, A.S.; TATOR, C.H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg.*, v.47, n.4, p.577-581, 1977.

RODRIGUES HELL, R.C.; COSTA, M.M.S.; GOES, A.M. et al. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol. Disease*, v.33, p.290–300, 2009.

ROUX, P.P.; BARKER, P.A. Neurotrophin signaling through the p75

neurotrophin receptor. *Progress Neurobiol.*, v.67, p.203-33, 2002.

SANCHEZ-RAMOS, J.; SONG, S.; CARDOZO-PELAEZ, F. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.*, v.164, p.247–256, 2000.

SANBERG, P.R.; WILLING, A.E.; GARBUZOVA-DAVIS, S. et al. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann. New York Acad. Sci.*, v.1049, p.67-83, 2005.

SAVILLE, L.R., POSPISIL, C.H., MAWHINNEY, L.A. et al. A monoclonal antibody to CD11d reduces the inflammatory infiltrate into the injured spinal cord: a potential neuroprotective treatment. *J. Neuroimmunol.*, v.156, p.42–57, 2004.

SAVIO, T.; SCHWAB, M. Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.87, p.4130–4133, 1990.

SCHEFF, S.W.; SAUCIER, D.A.; CAIN, M.E. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score. *J. Neurotrauma*, v.19, p.1251–1260, 2002.

SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H. et al. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, v.11, p.3648–3658, 1999.

SCHWARTZ, J. P.; NISHIYAMA, N. Neurotrophic factor gene expression in astrocytes during development and

- following injury. *Brain Res. Bull.*, v.35, p.403–407, 1994.
- SEDY, J.; URDZIKOVA, L.; HEJC, L., A. et al. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J. Neurotrauma*, v.24, p.1487–1501, 2007a.
- SEDY, J.; URDZIKOVA, L.; JENDELOVA, P. et al. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.32, p.550–580, 2008.
- SEDY, J.; URDZIKOVA, L.; LIKAVCANOVA, K. et al. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci. Lett.*, v.423, p.167–171, 2007b.
- SHIMIZU, S.; KONISHI, A.; KODAMA, T. et al. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.97, p.3100–3105, 2000.
- SHOJO, H.; KIBAYASHI, K. Changes in localization of synaptophysin following fluid percussion injury in the rat brain. *Brain Res.*, v.1078, p.198–211, 2006.
- SHORES, A. Spinal trauma: pathophysiology and management of traumatic spinal injuries. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.85, p.724–739, 1992.
- SIESJO, B. Historical overview: calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann. New York Acad. Sci.*, v.522, p.638–661, 1988.
- SILVA, C.M.O.; MELO, E.G.; ALMEIDA, A.E.R.F. et al. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.60, p.641–650, 2008.
- SILVER, J.; MILLER, J.H. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.5, p.146–156, 2004.
- SUGITA, S.; JANZ, R.; SÜDHOF, T.C. Synaptotagmins regulate Ca²⁺-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.18893–18901, 1999.
- SYKOVA, E.; HOMOLA, A.; MAZANEC, R. et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant.*, v.15, p.675–687, 2006.
- SYKOVA, E.; JENDELOVA, P. Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann. New York Acad. Sci.*, v.1049, p.146–160, 2005.
- TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Progress Neurobiol.*, v.56, p.341–358, 1998.
- TARLOV, I.M. Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs. *Am. Med. Assoc. Arch. Neurol. Psych.*, v.71, p.588–597, 1954.
- TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis

on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.*, v.75, p.15-26, 1991.

TATOR, C.H.; KOYANAGI, I.
Vascular mechanisms in the pathology of human spinal cord injury. *J. Neurosurg.*, v.86, p.483-492, 1997.

TATOR, C.H.; ROWED, I.W. Currents concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can. Med. Assoc. J.*, v.121, p.1453-1464, 1979.

TENG, K.K.; HEMPSTEAD, B.L.
Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.*, v.61, p.35-48, 2004.

THIELE, C.; HANNAH, M.J.; FAHRENHOLZ, F. et al. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.*, v.2, p.42-49, 2000.

THURET, S.; MOON, L.D.F.; GAGE, F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.7, p.628-643, 2006.

TOBIAS, C.A.; SHUMSKY, J.S.; SHIBATA, M. et al. Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration. *Exp. Neurol.*, v.184, p.97-113, 2003.

TORRES, B.B.J. Efeitos do dantrolene sódico em ratos adultos com trauma medular agudo experimental. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

em Medicina Veterinária. Belo Horizonte, Escola de Veterinária - UFMG, 2008. 46p.

TORRES, B.B.J.; CALDEIRA, F.M.C.; GOMES, M.G. et al. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal cord after traumatic injury in rats. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.91, p.530-536, 2010.

TROPEL, P.; NOËL, D.; PLATET, N. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell Res.*, v.295, p.395-406, 2005.

TUSZYNSKI, M.H.; PETERSON, D.A.; RAY, J. et al. Fibroblasts genetically modified to produce nerve growth factor induce robust neuritic ingrowth after grafting to the spinal cord. *Exp. Neurol.*, v.126, p. 1-14, 1994.

URDZIKOVA, L.; VANICKY, I. Post-traumatic moderate systemic hyperthermia worsens behavioural outcome after spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord*, v.44, p.113-119, 2006.

VALTORTA, F.; PENNUTO, M.; BONANOMI, D. et al. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*, v.26, p.445-453, 2004.

VAN MEETEREN, N.L.; EGGERS, R.; LANKHORST, A.J. et al. Locomotor recovery after spinal cord contusion injury in rats is improved by spontaneous exercise. *J. Neurotrauma*, v.20, p.1029-1037, 2003.

- VAQUERO, J.; ZURITA, M.; OYA, S. et al. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosci. Lett.*, v.398, p.129–134, 2006.
- VAYNMAN, S.; YING, Z.; WU, A. et al. Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity. *Neuroscience*, v.139, p.1221–1234, 2006.
- VON EULER, M.; AKESSON, E.; SAMUELSSON, E.B. et al. Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.*, v.137, p.242–254, 1996.
- VON EULER, M.; SEIGER, A.; SUNDSTRO, M, E. Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp. Neurol.*, v.145, p.502–510, 1997.
- WAGNER, F.C.; VANGILDER, J.C.; DOHMANN, G.J. Pathological changes from acute to chronic in experimental spinal cord trauma. *J. Neurosurg.*, v.48, p.92–98, 1978.
- WATT, F. Epidermal stem cells: markers patterning and the control of stem cell fate. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B: Biological Sciences*, v.353, p.831, 1997.
- WILLERTH, S.; SAKIYAMA-ELBERT, S.E. Cell therapy for spinal cord regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.60, p.263–276, 2008.
- WOLF, H.K.; BUSLEI, R.; SCHMIDT-KASTNER, R. et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J. Histochem. Cytochem.*, v.44, p.1167–1171, 1996.
- XIE, F.; ZHENG, B. White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp. Neurol.*, v.209, p.302–312, 2008.
- YAKOVLEV, A.G.; FADEN, A.I. Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. *Mol. Neurobiol.*, v. 24, p.131–144, 2001.
- YIU, G.; HE, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.7, p.617–627, 2006.
- YONG, V.W.; MOUMDJIAN, R.; YONG, F.P. et al. Gamma-interferon promotes proliferation of adult human astrocytes in vitro and reactive gliosis in the adult mouse brain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.88, p.7016–7020, 1991.
- YOSHIHARA, H.; SHUMSKY, J.S.; NEUHUBER, B. et al. Combining motor training with transplantation of rat bone marrow stromal cells does not improve repair or recovery in rats with thoracic contusion injuries. *Brain Res.*, v.1119, p.65–75, 2006.
- YU, W.; HAO, J.X.; XU, X.J. et al. Long-term alleviation of allodynia-like behaviors by intrathecal implantation of bovine chromaffin cells in rats with spinal cord injury. *Pain*, v.74, p.115–122, 1998.
- ZHANG, Q.; MADONNA, R.; SHEN, W. et al. Stem cells and cardiovascular tissue repair: mechanism, methods, and

clinical applications. *J. Cardiothorac.*

Ren. Res., v.1, p.3-14, 2006.