

BRUNO BENETTI JUNTA TORRES

**DANTROLENE E CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DO  
TRAUMA MEDULAR AGUDO EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal, área de Medicina e Cirurgia Veterinárias, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte  
UFMG - Escola de Veterinária  
2014

T693d Torres, Bruno Benetti Junta, 1981-  
Dantrolene e células-tronco mesenquimais no tratamento do trauma medular agudo em ratos Wistar / Bruno Benetti Junta Torres. – 2014.

80 p. : il.

Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo

Co-orientador: Rubens Antônio Carneiro

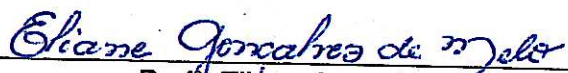
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

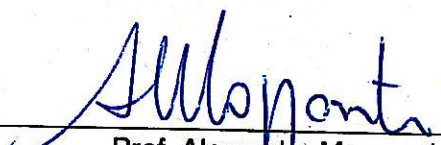
1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Traumatismo da medula espinhal – Teses. 3. Medicamentos – Administração – Teses. I. Melo, Eliane Gonçalves de. II. Carneiro, Rubens Antônio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 7

Tese defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof.<sup>a</sup> Eliane Gonçalves de Melo  
Presidente - Orientadora



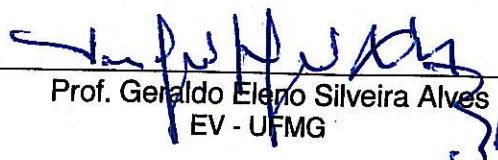
Prof. Alexandre Mazzanti  
Universidade Federal de Santa Maria - RS



Dra. Milene Alvarenga Rachid  
ICB - UFMG



Prof.<sup>a</sup> Ana Carolina Mortari  
Universidade de Brasília - UNB



Prof. Geraldo Eleno Silveira Alves  
EV - UFMG



*Aos meus avós maternos Ângela Benetti Junta (in memoriam) e Noécio Junta,  
e aos paternos Marinete Nunes Vieira Torres (in memoriam) e Luís Alves Torres...*

*...dedico*

*Ao meu grande, inseparável, insuperável e melhor cão do mundo, Arthus...*

*...dedico*

*“Gosto daquilo que me desafia.  
O fácil nunca me interessou.  
Já o obviamente impossível,  
sempre me atraiu, e muito.”*

*(Clarice Lispector)*

## AGRADECIMENTOS

Às energias que regem o equilíbrio da vida e nos permitem escolher os rumos de nossos passos.

Aos meus pais José Luiz e Rita, à Denise e ao João, ao nosso pequeno Felipe, que tem me motivado a “quebrar o gelo” e buscar dentro de mim uma pessoa menos “racional”, e à toda família. Agradeço pela paciência e compreensão de minha “ausência” durante todos esses anos. Agradeço em especial aos meus tios Luisinho e Rose e minha prima-irmã Tathiany, que me acolheram na fase final, mais difícil e de mudanças bruscas.

À Professora Eliane Gonçalves de Melo, pela orientação, amizade e confiança em mim depositados, uma vez mais. Obrigado, principalmente, pelos conselhos e incentivo frente aos novos desafios, como foi assumir o cargo de docente temporário na UFLA, em meio ao doutorado.

Agradeço à todos os Professores que contribuíram direta ou indiretamente com a realização de mais essa etapa e que me incentivaram pessoal e profissionalmente. Ao Mauro, amigo de longa data e conselheiro mesmo à distância. Ao Professor Geraldo Eleno, homem sábio, mais que um Professor, um Educador, que me ensinou a ouvir um pouco mais, a reconhecer, expor e encarar os erros e medos para, a partir daí, aprender, aceitar, acertar e ser uma pessoa melhor!

Obrigado a todos que de alguma forma contribuíram em alguma das diversas fases experimentais. Gabriela e Sandro no manejo e avaliações clínicas dos animais; Mário e Carlinha no auxílio dos procedimentos anestésicos e cirúrgicos; Professora Rogéria, Jankerle e Endrigo no Laboratório de Terapia Celular; Professoras Marília e Fabíola com as análises hematológicas e bioquímicas; Professora Milene e Pâmela por ajudarem nas avaliações histológicas; Jordana e Graciela pela primordial ajuda, sempre com muita atenção, disponibilidade, positivismo e paciência, inerentes às suas personalidades, em toda etapa de RT-PCR; Professor Frederico que ajudou de maneira brilhante na interpretação dos dados de RT-PCR, iluminando nossos resultados; e Renato sempre auxiliando nas avaliações estatísticas. À vocês meu muito obrigado!

Não poderia deixar de agradecer atenciosamente ao meu amigo Bernardo, pelo apoio incondicional em todas as etapas desse trabalho, e de muitos outros com os quais o desafiei. Uma pessoa de um caráter admirável, que quando entrou no programa de pós-graduação em 2010 “um pouco desacreditado” e “sem muitas expectativas”, me deu a mão e topou encarar os desafios da Neurologia Veterinária. Hoje, um profissional de qualidade inquestionável, competente e como poucos. Tenho orgulho de saber que pude contribuir um pouquinho com esse crescimento. Obrigado por também me desafiar e me fazer crescer com cada paciente, cada discussão de caso, com nossos muitos projetos e trabalhos, finalizados ou em andamento! Ainda temos muito a contribuir para nossos pacientes.

Agradeço aos Professores Rubens, Milene e Rogéria, pela parte que coube a cada um, como meus co-orientadores durante essa caminhada, e como integrantes dos exames de Qualificação e Pré-defesa, contribuindo sobremaneira com críticas e sugestões, as quais ajudaram a engrandecer o trabalho.

Agradeço à presteza e consideração demonstradas pelos membros convidados a comporem a banca de avaliação do meu trabalho final, Professores Alexandre Mazzanti (UFSM-RS), Ana Carolina Mortari



(UNB-DF), Milene Alvarenga Rachid (ICB/UFMG-MG), Geraldo Eleno Silveira Alves (EV/UFMG-MG), Rubens Antônio Carneiro (EV/UFMG-MG) e aos suplentes Rafael Resende Faleiros (EV/UFMG-MG) e Vitor Márcio Ribeiro (PUC-Betim-MG).

Aos residentes, demais pós-graduandos e veterinários do HV-UFMG pelo convívio. Agradeço de coração aos funcionários em geral da Escola de Veterinária, à equipe da limpeza das estruturas físicas utilizadas, as secretárias em geral, aos técnicos de enfermagem, farmácia, laboratórios, imagem, esterilização, portarias e seguranças, sem cada um de vocês nada disso seria possível. Em especial ao “Carlitos”, que nos fazia sorrir quando quisemos chorar, seu bom humor é contagiante!

Agradeço ainda, à Claudia Niemeyer pelo apoio ao abrir as portas do Laboratório de Patologia Comparada da Universidade de São Paulo (USP), e a minha “priminha” Tathiany e Prof. Richardt Landgraf por abrirem as portas do Laboratório de Inflamação e Farmacologia Vascular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), onde pude concluir as capturas das fotomicroscopias presentes neste trabalho.

Agradeço à UFLA, minha eterna segunda casa, onde me formei e, durante o doutorado, tive o grande prazer em retornar como Professor Associado temporário. Com muito esforço e dedicação, acredito ter alcançado meus objetivos ali dentro, contribuindo para alavancar a qualidade do já renomado curso de Medicina Veterinária. Obrigado em especial aos Professores Gabriela, Leonardo e Ruthnéa Muzzi, Fernando, Rodrigo, Carlos Arthur, Lacrete, Raimundo e Henrique. Obrigado aos demais professores do DMV-UFLA pelo convívio acolhedor e amigável.

Aos residentes do HV-UFLA Camila, Mari, Vaninha, Rodrigo e Letícia, da Clínica Médica, Gui, Guigo, Fernando (Japa), Filipe, Tuca e Raquel, da Clínica Cirúrgica e Anestesiologia, e Ingrid, Val e Carol da imagem, com os quais tive o prazer de trabalhar, ensinar e aprender. À todos os pós-graduandos. Aos funcionários, Gesislaine, Érica, dona Mary, dona Virgínia, seo Maurício e todos os demais, obrigado pela convivência sempre alegrando nossos dias. Obrigado a cada um dos meus alunos, em especial “meus orientados” Lucas (Xacy), Mayara, Julia, David, Luísa, Pâmela, Liudimila, e demais alunos de vivência dos atendimentos de Neurologia e Neurocirurgia.

Ao meu grande amigo-irmão Renato Faria pelos momentos de parceria, descontração e amizade. Obrigado por cada conselho e por cada minuto dedicado à me ouvir, nos bons e maus momentos, amenizando duros dias de trabalho. Também aos meus queridos e eternos amigos Aninha, Jordana, Glauco, Bernardo, Guilherme e Stephanie, por tornarem minha vida de doutorando Belo Horizontino muito mais agradável e divertida. Nunca esquecerei as fases e cada momento divertidos que vivemos na República Zona Urbana e nas madrugadas adentro, por todos os cantos de nossa querida capital mineira!

Aos meus queridos e antigos amigos Gabriel, Daniel, Milena, Erik, Renata, Roger, Iuri, Rosane que à distância sempre acompanharam minha trajetória e me recebiam de braços abertos cada vez que os encontrava. À família República Zona Rural, a todos vocês meus amigos, os de ontem, os de hoje e os de amanhã, minha imensa gratidão, por toda amizade, companheirismo e descontração, e por perpetuarem nosso lema de “a melhor casa de tolerância do Brasil”!

Agradeço imensamente a toda equipe de Neurologia e Neurocirurgia da *Royal Veterinary College (UK)* que me acolheram e incentivaram meu crescimento profissional, em especial a Kate Chandler que, inicialmente, abriu as portas para mim, e ao meu amigo e sempre orientador Holger Andrea Volk, que me mostrou a diferença do que é fazer MEDICINA veterinária.

Agradeço aos Veterinários de Belo Horizonte e região metropolitana, principalmente, aos colegas das clínicas São Francisco de Assis, CLIVET, VISIOVET, com os quais tive o prazer de conviver, e por onde prestei serviços, consultoria e aprendi com cada paciente que atendi. Minha admiração especial à M.V. Andrêssa De Marco, da clínica Professor Israel, pelo potencial e competência indiscutíveis e seu jeitinho diferenciado com os animais. Aos meus amigos ANCLIVEPANOS de MG pelos anos de trabalho e parcerias realizadas.

À recém formada Associação Brasileira de Neurologia Veterinária, cujo cargo científico demandou tempo e atenção, em meio as atividades do doutorado e da docência na UFLA. Agradeço aos demais membros diretores, Ronaldo, Mônica, Ragnar, Alex Adeodato, Mazzanti, Vitor, e Rogério, e TODOS que estão nos “bastidores”, pela realização de um sonho antigo e prol de alavancar a qualidade da área no Brasil. Muito já foi feito, mas temos muito trabalho pela frente.

Obrigado aos amigos Dilso, Dalmar, Marilene e toda família Medvep, por acreditarem e incentivarem meu trabalho e idealismo, desde meu retorno ao Brasil com ideias “inovadoras”, por vezes criticadas / reprovadas por “colegas”. Boas parcerias queremos para o resto da vida! Ao Instituto Qualittas de Pós-Graduação, onde tenho prazer de compor o corpo docente, e onde estou tendo oportunidade de conhecer e aprender com os demais professores e alunos, em cada cantinho desse país que visito para lecionar.

À Cristália, mais uma vez suportando e incentivando nossas ideias e pesquisas. Conto com essa parceria que tem gerado frutos e acredito que temos nas mãos uma “pedra bruta”, ainda a ser muito mais “lapidada” que se chama DANTROLENE. Agradeço também ao CNPq e à FAPEMIG.

Para concluir, agradeço ao Arthus, meu cão e melhor amigo, e à todos os animais pacientes meus ou não, cuja saúde é o objetivo maior de nossos esforços e motivação de continuar essa empreitada! Vocês fazem de minha vida muito mais feliz!

**MINHA ETERNA GRATIDÃO!**

## EPÍGRAFE

“Chega! Acabou. Não sei se para sempre, mas por enquanto basta! Chegou a hora de nos separarmos... cada um segue sua vida a partir daqui. Vamos olhar para frente! É claro que você vai fazer falta, em vários aspectos, em outros nem tanto, e sei que você dirá o mesmo de mim!

Foram longos 14 anos e 9 meses de uma relação que me fez amadurecer, me proporcionou crescimento profissional, pessoal, foi com quem eu vivi grandes fases, as melhores da minha vida talvez. Com você eu fui mais eu! Com você eu aprendi mais sobre mim mesmo, a me conhecer, a me respeitar, a me valorizar, aceitar e tentar melhorar meus defeitos, que eu sei que não são poucos! Também aprendi a te respeitar, e a todos que estão contigo, o que no início, não foi fácil. Até porque quando nos conhecemos, não foi o que poderíamos chamar de amor à primeira vista, muito pelo contrário... eu não via a hora de te deixar.

Mas aos poucos fui me apaixonando por você e, a cada dia, deixava meus preconceitos de lado para aproveitar tudo o que tinha para me oferecer. Naquela época eu era um menino imaturo, recém saído das barras da saia da mamãe. E a partir dali, seríamos só nós dois! Acho que o final foi feliz e proveitoso para ambos, não é? Tivemos uma relação sensacional! Só quero que saiba, que sempre que puder eu vou te procurar, te reencontrar, aproveitar sua cia, e tudo e todos que você colocou em minha vida!

Não vai ser nada fácil para nós, eu sei... mas é hora de encarar que precisamos renovar essa relação e, a partir de agora, cada um buscar o que for melhor em novos caminhos. Sempre terei orgulho de você!

Desculpe, mas preciso partir, voltar pro lugar de onde eu vim, retomar minhas origens, rever meu caminho, retomar as rédeas e o controle da minha vida, correr novos riscos e me lançar a novos desafios. Tenha certeza de uma coisa, sempre falarei em alto e bom tom que sou e sempre serei apaixonado por você!

Muito obrigado minha querida, minha eterna MINAS GERAIS!”

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$  = microlitro  
A = adenina  
AMPA =  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol  
ácido propiônico  
BBB = escala de Basso, Beattie e Bresnahan  
BDNF = fator neurotrófico derivado do encéfalo  
C = citosina  
cDNA = ácido desoxirribonucleico  
complementar  
CEUA = comitê de ética no uso de animais  
GC = glicocorticoide  
CM = capacidade motora  
CN = controle negativo  
CP = controle positivo  
CRASH = *Corticosteroid Randomisation after  
Significant Head Injury*  
CT = células-tronco  
Ct = ciclo de *threshold*  
CTE = células-tronco embrionárias  
CTM = células-tronco mesenquimais  
CTN = células-tronco neurais  
DAB = 3-3' diaminobenzina peroxidase  
DAN = dantrolene  
DMEN = *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.  
g = força g  
g = grama  
G = guanina  
GABA = ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GFP = *green fluorescent protein*  
GM-1 = monosialotetrahexosil-gangliosideo  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  = fosfato monobásico de potássio  
L1 = 1ª vértebra lombar  
L3 = 3ª vértebra lombar  
LD50 = dose letal em 50% da população  
LOX = lipoxigenase  
M = molar  
mL = mililitro  
mM = milimolar

MSCs = *mesenchymal stem cells*  
mRNA = ácido ribonucleico mensageiro  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  = fosfato monobásico sódico  
NASCIS = *National Acute Spinal Cord Injury  
Study*  
NC = *negative control*  
NeuN = *neuronal nuclei*  
ng = nanograma  
NMDA = N-metil-D-aspartato  
NT-3 = neurotrofina 3  
NYU = impactador *New York University*  
 $^\circ$  = grau de inclinação ou ordem  
PBS = *phosphate buffered saline*  
PC = *positive control*  
PI = plano inclinado  
pmol = picromol  
PP = posicionamento proprioceptivo  
PT = posicionamento tátil  
RLO = radicais livres de oxigênio  
RT-PCR = reação em cadeia da polimerase via  
transcriptase reversa  
RYR = receptor rianodina  
SCI = *spinal cord injury*  
SD = sensibilidade dolorosa  
SNK = Student-Newman-Keuls  
T = timina  
T12 = 12ª vértebra torácica  
T13 = 13ª vértebra torácica  
T2 = 2ª vértebra torácica  
T6 = 6ª vértebra torácica  
T8 = 8ª vértebra torácica  
TMA = trauma medular agudo  
 $\text{TNF-}\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa  
TrK = receptores transmembranas da tirosina  
cinase  
TUNEL = *Terminal deoxynucleotidyl  
transferase*  
U = unidade  
UV = ultravioleta  
X = vezes

---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE TABELAS .....	15
LISTA DE FIGURAS .....	15
RESUMO .....	18
ABSTRACT .....	18
1. INTRODUÇÃO .....	19
2. OBJETIVOS .....	21
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	21
3.1 Fisiopatogenia do trauma medular agudo .....	22
3.1.1 Eventos primários .....	22
3.1.2 Eventos secundários .....	23
3.1.3 Resposta do organismo frente ao trauma .....	25
3.2 Tratamento farmacológico do trauma medular agudo .....	26
3.2.1 Corticoterapia .....	26
3.2.2 Outras classes farmacológicas já estudadas .....	27
3.2.3 Bloqueadores de canais de cálcio .....	28
3.3 Tratamento com células-tronco .....	29
3.3.1 Células-tronco mesenquimais .....	30
3.3.2 Fatores neurotróficos .....	31
3.4 Estudo experimental das lesões medulares .....	32
3.5 Testes comportamentais para avaliação neurológica em ratos .....	32
3.5.1 Escala de BBB .....	33
3.5.2 Método de escala descritiva adaptada .....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	35
4.1 Isolamento e cultivo de CTM da medula óssea .....	35
4.2 Caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo .....	36

4.3	Preparação das CTM para o transplante celular.....	36
4.4	Animais.....	37
4.5	Grupos experimentais .....	37
4.6	Protocolos anestésico e cirúrgico.....	37
4.7	Inoculação de PBS ou de CTM.....	38
4.8	Testes comportamentais.....	38
4.9	Avaliação anatomopatológica da medula espinhal e demais órgãos sistêmicos .....	42
4.10	Avaliação imunoistoquímica da medula espinhal.....	43
4.11	RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores neurotróficos BDNF e NT-3, e dos fatores associados a apoptose Bcl-xl, Bcl-2, Bax, caspase-3 e caspase- 9.....	43
4.11.1	Isolamento do RNA.....	44
4.11.2	Síntese do cDNA .....	45
4.11.3	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real.....	45
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.1	Caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo.....	46
6.2	Procedimentos cirúrgicos.....	47
6.3	Testes Comportamentais.....	49
6.4	Avaliação anatomopatológica dos órgãos sistêmicos .....	55
6.5	Avaliação anatomopatológica da medula espinhal .....	55
6.6	Avaliação imunoistoquímica da medula espinhal.....	58
6.7	Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs dos fatores neurotróficos BDNF e NT-3 .....	61
6.8	Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs dos fatores antiapoptóticos (Bcl-2 e Bcl-xl) e pró-apoptóticos (Bax, caspase-3 e caspase-9).....	64
7.	PERSPECTIVAS.....	68
8.	CONCLUSÕES.....	69
9.	REFERÊNCIAS .....	69

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Fármacos com potenciais efeitos neuroprotetores estudados para terapia do trauma medular..	27
Tabela 2 - Grupos experimentais.....	37
Tabela 3 - Protocolo da escala de BBB (Basso, Beatie e Bresnahan) para avaliação do desempenho locomotor, com os respectivos escores (Basso et al., 1996).....	41
Tabela 4 - Protocolo do método de escala descritiva adaptada para avaliação dos testes comportamentais com os respectivos escores, conforme Silva et al. (2008) .....	42
Tabela 5 - Genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.....	44
Tabela 6 - Médias e erros-padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos por campo, em segmentos cranial e caudal ao epicentro do TMA, em medula espinhal de ratos Wistar .....	59

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar. A) Animal posicionado em decúbito esternal sobre mesa cirúrgica. Anestesia por meio de máscara em sistema semiaberto; B) Campo cirúrgico com identificação dos processos espinhosos (seta preta); C) Visualização da medula espinhal com aspecto normal após laminectomia dorsal (ponta da pinça); D) Aparelho estereotáxico contusivo/compressivo.....	40
Figura 2 - Fotomicroscopia de células-tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea de ratos, cultivada em garrafa T75 cm <sup>2</sup> contendo DMEM e 10% de soro fetal bovino, vista em microscópio invertido (100 µm).....	46
Figura 3 - Histogramas da citometria de fluxo com o padrão de expressão das moléculas de superfície presentes em CTM indiferenciadas da medula óssea de ratos após oitava passagem. 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 101).....	47
Figura 4 - Gráfico da escala de BBB (Basso, Beatie e Bresnahan), mostrando a evolução dos escores (médias) da avaliação em campo aberto, entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com CTM, células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM ou CTM+DAN apresentaram recuperação funcional significativa em relação aos do CP a partir do 22º e 25º dias de observação, respectivamente (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). .....	52
Figura 5 - Gráfico do teste de Sensibilidade Dolorosa (SD), mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM, CTM+DAN ou DAN apresentaram recuperação significativa da SD em relação aos do	

CP a partir do 4º, 7º e 10º dias de observação, respectivamente (\*\*p<0,01; p<0,001). No 7º dia, os animais tratados com DAN apresentaram maior SD do que os tratados com CTM (+++p<0,001) ou com CTM+DAN (###p<0,01)..... 52

Figura 6 - Gráfico do teste de Capacidade Motora (CM) mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM, CTM+DAN ou DAN apresentaram recuperação significativa da CM em relação aos do CP a partir do 13º, 16º e 22º dias de observação, respectivamente (\*p<0,05; \*\*p<0,01; p<0,001). ..... 53

Figura 7 - Gráfico do teste de Posicionamento Proprioceptivo (PP) mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM apresentaram recuperação significativa do PP em relação aos do CP a partir do 22º dia de observação (\*\*p<0,01). ..... 53

Figura 8 - Gráfico do teste de Posicionamento Tátil (PT) mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM apresentaram recuperação significativa do PP em relação aos do CP a partir do 22º dia de observação (\*\*p<0,01). ..... 54

Figura 9 - Gráfico do teste de Plano Inclinado (PI) mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com DAN ou CTM apresentaram recuperação significativa da capacidade de manterem-se em PI em relação aos do CP a partir do 22º e 25º dias de observação, respectivamente (\*p<0,05; \*\*p<0,01). .. 54

Figura 10 - - Fotomicroscopias de secções transversais de medula espinhal de ratos Wistar, coradas em H.E. A) Medula espinhal normal de animal do grupo controle negativo, submetido apenas à laminectomia; B) Secção 4 mm cranial ao epicentro da lesão após trauma medular agudo; C) Epicentro da lesão após trauma medular agudo; D) Secção 4 mm caudal ao epicentro da lesão após trauma medular agudo (40 X). Detalhes mostrando cavidade cística (asterisco) (E, 200 X) e discreta gliose (F, 400 X), caracterizando processo de mielomalacia crônica focalmente extensa. .... 57

Figura 11 - Fotomicroscopias de secções transversais de medula espinhal 4 mm adjacentes ao epicentro da lesão em ratos Wistar. Imunoistoquímica com anti-NeuN (100 x). A) Detalhe de marcação de núcleos de corpos neuronais íntegros (NeuN-positivos) na substância cinzenta (animal do grupo controle negativo) B) Detalhe de neurônio não marcado pelo anti-NeuN (seta vermelha) (animal do grupo controle positivo); C) Detalhe de marcação de neurônios sensoriais NeuN-positivos nos cornos dorsais (animal do grupo células-tronco mesenquimais e dantrolene); D) Detalhe de marcação de neurônios motores NeuN-positivos nos cornos ventrais (animal do grupo dantrolene). ..... 59

Figura 12 - Gráficos das médias e erros-padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos por campo, em segmentos cranial e caudal ao epicentro do TMA, em medula espinhal de ratos Wistar. CTM – células-



tronco mesenquimais; CTM + DAN – células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene; DAN – dantrolene; CP - controle positivo; CN - controle negativo. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). ..... 60

Figura 13 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e da neurotrofina-3 (NT-3). Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo CP em relação ao grupo CN (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CP - controle positivo; CN - controle negativo (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). ..... 61

Figura 14 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e da neurotrofina-3 (NT-3). Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, dos grupos CTM, CTM+DAN e DAN em relação ao grupo CP (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CTM – células-tronco mesenquimais; CTM+DAN - células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene; DAN – dantrolene; CP - controle positivo (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). ..... 63

Figura 15 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-xl. Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo CP em relação ao grupo CN (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CP - controle positivo; CN - controle negativo. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). ..... 65

Figura 16 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores pró-apoptóticos Bax, caspase-3 e caspase-9. Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo CP em relação ao grupo CN (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CP - controle positivo; CN - controle negativo (\*  $p < 0,05$ ). ..... 65

Figura 17 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-xl. Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, dos grupos CTM, CTM+DAN e DAN em relação ao grupo CP (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CTM – células-tronco mesenquimais; CTM+DAN - células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene; DAN – dantrolene; CP - controle positivo (\*  $p < 0,05$ ). ..... 67

Figura 18 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores pró-apoptóticos Caspase-3, Caspase-9 e Bax. Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, dos grupos CTM, CTM+DAN e DAN em relação ao grupo CP (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CTM – células-tronco mesenquimais; CTM+DAN - células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene; DAN – dantrolene; CP - controle positivo (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). ..... 68

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do dantrolene (DAN) e das células-tronco mesenquimais (CTM) no trauma medular agudo (TMA). Foram utilizados 60 ratos Wistar, machos com três meses de idade, divididos nos grupos CTM, DAN + CTM, DAN, controle positivo (CP) (trauma e placebo) e controle negativo (CN) (sem trauma e placebo). Realizou-se laminectomia de T12 em todos os grupos, seguida de TMA contusivo/compressivo, com exceção do grupo CN. Uma hora depois, os grupos DAN + CTM e DAN receberam 10mg/kg de DAN em dose única, por via intraperitoneal e, após sete dias, os grupos CTM e DAN + CTM receberam  $1 \times 10^6$  células, por via intravenosa. Testes comportamentais foram realizados para avaliar a recuperação funcional, por meio da escala de BBB e pelo método de escala descritiva adaptada, durante 30 dias. Para avaliação da medula espinhal foram realizadas histologia em H.E., imunohistoquímica com anti-NeuN e RT-PCR em tempo real para avaliar a expressão gênica dos fatores neurotróficos (BDNF e NT-3) e das proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xl) e pró-apoptóticas (caspase-3, caspase-9 e Bax), nos segmentos craniais e caudais ao epicentro da lesão. Os animais traumatizados apresentaram paraplegia grave e retenção urinária com cistite hemorrágica. Houve recuperação funcional significativa nos grupos tratados com CTM, DAN ou associação ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo CP. Histologicamente, observou-se lesão espinhal grave, caracterizada por degeneração axonal e perda neuronal, estendendo-se craniocaudalmente ao epicentro. Todos os grupos apresentaram maior número médio de neurônios NeuN-positivos que os do CP ( $p < 0,05$ ). O TMA resultou em diminuição da expressão de BDNF, NT-3 e Bcl-xl, e aumento da expressão de caspase-3 e Bax em relação às medulas espinhais de animais do CN. Após o tratamento, observou-se aumento significativo da expressão de BDNF nos grupos CTM, CTM + DAN e DAN em relação ao grupo CP ( $p < 0,05$ ). Já a expressão da NT-3, mostrou-se maior nos grupos CTM + DAN e DAN nos segmentos craniais ( $p < 0,05$ ), e DAN nos caudais ( $p < 0,01$ ). A expressão de Bax foi significativamente menor nos grupos CTM + DAN ( $p < 0,05$ ) e DAN ( $p < 0,001$ ). A expressão das caspases 3 e 9 foi significativamente menor nos grupos DAN, CTM e CTM + DAN ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que o DAN, as CTM ou associação de ambos, para tratamento de TMA em ratos, são protocolos seguros, promovem recuperação funcional e efeitos neuroprotetores, neurotróficos e antiapoptóticos.

Palavras-chave: trauma medular agudo, células-tronco mesenquimais, dantrolene, NeuN, RT-PCR em tempo real, apoptose, neurotrofinas, rato.

## ABSTRACT

*This study aimed to evaluate the effects of dantrolene (DAN) and mesenchymal stem cells (MSCs) in acute spinal cord injury (SCI). Sixty three-months-old male Wistar rats were divided into groups MSCs, MSCs + DAN, DAN, positive control (PC) (trauma and placebo) and negative control (NC) (no trauma and placebo). Laminectomy was performed at T12 level in all animals, followed by a weight-drop model of SCI, except for the NC group. An hour later, the MSCs + DAN and DAN groups received 10mg/kg of DAN in a single dose, intraperitoneally, and after seven days, the MSCs and MSCs + DAN groups received  $1 \times 10^6$  cells intravenously. Functional recovery was assessed through BBB and adapted descriptive scale methods for 30 days. Spinal cord was evaluated with H.E., immunohistochemistry with anti-NeuN, and real time RT-PCR to assess gene expression of neurotrophic factors (BDNF and NT-3), antiapoptotic (Bcl-2 and Bcl-xl) and pro-apoptotic proteins (caspase-3, caspase-9 and Bax), in the cranial and caudal segments from the lesion epicenter. Traumatized animals showed severe paraplegia and urinary retention with hemorrhagic cystitis. There was a significant recovery in groups MSCs, DAN and MSCs + DAN ( $p < 0.05$ ) compared to PC. Histologically, there was no systemic changes. It was observed severe spinal injury, characterized by axonal degeneration and neuronal loss, which extended cranio-caudally from epicenter. All groups showed average number of NeuN-positive neurons significantly higher when compared to PC ( $p < 0.05$ ). The SCI resulted in reduced BDNF, NT-3 and Bcl-xl gene expression, and increased Bax and caspase-3 expression.*

After treatments, there was a significant increase in BDNF expression in MSCs, MSCs + DAN and DAN groups compared to PC group ( $p < 0.05$ ). The NT-3 expression was higher in MSCs + DAN and DAN groups in cranial segments ( $p < 0.05$ ), and DAN group in the caudal ones ( $p < 0.01$ ). The Bax expression was significantly lower in the MSCs + DAN ( $p < 0.05$ ) and DAN ( $p < 0.001$ ). The caspase-3 and 9 expression were significantly lower in DAN, MSCs and MSCs + DAN groups ( $p < 0.05$ ). It was concluded that DAN, MSCs or the combination of both for the treatment of SCI in rats promote functional recovery and neuroprotection through neurotrophic and antiapoptotic effects.

**Keywords:** spinal cord injury, mesenchymal stem cell, dantrolene, NeuN, real time RT-PCR, apoptosis, neurotrophins, rat.

## 1. INTRODUÇÃO

O trauma medular gera perda de vidas, sofrimento e repercussões econômicas (Fernandez et al., 2006). Na Medicina Veterinária, as espécies domésticas estão susceptíveis a lesões medulares e muitas destas situações acabam evoluindo para a eutanásia do paciente acometido (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005). Para indivíduos com lesão da medula espinhal, a mudança de comportamento devido à dor é sobrepujada, não apenas pela diminuição ou ausência da habilidade de locomoção, mas também pelas disfunções intestinal, sexual e urinária (Torres et al., 2011).

Há décadas, a fisiopatologia e terapia das injúrias medulares tem sido exaustivamente pesquisadas. Existe um expressivo interesse em reconhecer e entender os mecanismos de degeneração e reparo do tecido neural, o que pode aumentar as chances de sucesso na recuperação dos pacientes (Dumont et al., 2001). Para isso, diferentes modelos *in vivo* tem sido utilizados para reproduzir aspectos da injúria medular, dentre os quais, o trauma contusivo/compressivo por peso em ratos é o mais representativo em mimetizar os mecanismos de lesão da medicina veterinária e humana (Basso et al., 1996; Silva et al., 2008; Torres et al., 2010a; Torres et al., 2010c).

O trauma medular produz dano primário no local do impacto, que é seguido por uma lesão secundária tardia que se estende craniocaudalmente, levando à degeneração progressiva do tecido neural. A neurodegeneração é caracterizada pela perda de neurônios e células gliais e, conseqüentemente, gera déficits funcionais motores, sensoriais e autonômicos (Crowe et al., 1997; Liu et al., 1997;

Beattie, 2004; Torres et al., 2011). A lesão secundária é desencadeada por uma série complexa de eventos celulares e moleculares, que induz a morte celular por apoptose dentro de poucas horas a vários dias após o trauma inicial (Mattson, 2000; Tagaki et al., 2003; Xu et al., 2008).

O processo de apoptose é influenciado por proteínas pró e antiapoptóticas em suas múltiplas etapas. O equilíbrio entre a cascata das proteínas indutoras da morte celular e das inibidoras da apoptose constituem ponto fundamental neste processo. Quando esse equilíbrio é desregulado, a apoptose representa importante mecanismo patogênico em doenças neurodegenerativas (Lou et al., 1998; Seki et al., 2003). Dentre os vários estímulos que promovem ativação dos fatores pró-apoptóticos e inibição dos antiapoptóticos, está a sobrecarga do íon cálcio ( $Ca^{2+}$ ) no meio intracelular (Happel et al., 1981; Springer et al., 2000; Nakayama et al., 2002; Kuwana e Newmeyer, 2003). Estudos demonstram que a liberação de  $Ca^{2+}$  das reservas intracelulares, como retículo endoplasmático, leva ao seu acúmulo citoplasmático que, por sua vez, sinaliza os neurônios para apoptose (Yano et al., 2001; Zhao et al., 2001; Orrenius et al., 2003; Tagaki et al., 2003).

As mudanças morfológicas e nucleares que ocorrem durante a apoptose são iniciadas e executadas por meio da ativação de fatores intrínsecos e extrínsecos, tanto intra como extracelulares, que sinalizam a célula à morte. Dentre esses fatores, estão as proteínas da família Bcl-2 (Kluck et al., 1997; Choi et al., 2003; Seki et al., 2003) e as proteases  $Ca^{2+}$  dependentes da família das caspases, em especial a caspase-3, que são sabidamente ativadas após o trauma

medular (Springer et al., 2000; McEwen e Springer, 2005; Springer et al., 2009).

Esses eventos promovem um microambiente inibitório que afeta ainda mais a capacidade regenerativa do sistema nervoso central (SNC) (Carlson et al., 1998; Oh et al., 2011). Além disso, outros fatores como ausência de substrato promotor de crescimento, processo inflamatório exacerbado, astrogliose reativa e formação de cicatriz glial, proteínas inibitórias de formação de mielina e de matrix extracelular, e quantidade insuficiente de suporte trófico, também impedem o brotamento e / ou regeneração dos axônios lesionados e a remielinização dos sobreviventes (Carlson et al., 1998; Sasaki et al., 2009; Kim et al., 2010; Hollis II e Tuszynski, 2011; McCall et al., 2012.).

A reversão desses eventos constitui uma das principais metas no tratamento de pacientes com lesão espinhal (Crowe et al., 1997; Fernandez et al., 2006). Entretanto, devido à complexidade das interrelações entre os diferentes mecanismos moleculares que participam das lesões secundárias, é improvável que uma única linha terapêutica promova retorno funcional completo (Barnabé-Heider e Frisén, 2008; Coutts e Keirstead, 2008). O papel da maioria das terapias na fase aguda pós-traumática deve ser preservar os axônios e maximizar suas funções, ao mesmo tempo que se objetiva limitar a subsequente perda neuronal e glial (Barnabé-Heider e Frisén, 2008; Coutts e Keirstead, 2008). Posteriormente, intervenções que visam a regeneração funcional de axônios lesionados e restauração de conexões supraespinhais interrompidas, são essenciais para a recuperação funcional do paciente (Jeffery e Blakemore, 1999; McCall et al., 2012). A real necessidade de terapias combinadas vem sendo amplamente aceita, e agentes que possam atuar em diferentes vias de sinalização envolvidas diretamente na lesão secundária são de particular interesse.

O dantrolene, um inibidor da liberação de reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$ , pelo bloqueio de receptores rianodina presentes no retículo endoplasmático, surge como uma opção terapêutica promitente (Ayar e Kelestimur, 2002; Kobayashi et al., 2005; Cherednichenko et al., 2008; Torres et al., 2010a). Seus efeitos neuroprotetores em modelos de trauma medular *ex vivo*, *in vivo* e *in vitro* já foram demonstrados

(Thorell et al., 2002; Kocogullari et al., 2008; Aslan et al., 2009). Recentemente, foi demonstrado o potencial efeito neuroprotetor do dantrolene por inibição de apoptose neuronal em modelo *in vivo* de trauma medular agudo (TMA) (Torres et al., 2010a).

Adicionalmente, o uso de terapia celular é uma estratégia promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas, seja via ação direta, por meio de sua diferenciação em neurônios que irão substituir aqueles que foram lesionados (Woodbury et al., 2000; Safford et al., 2004; Wang et al., 2008; Kang et al., 2012), seja via supressão de inflamação local, ou pela estimulação da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Himes et al., 2006; Rooney et al., 2009a; Rooney et al., 2009b; Kim et al., 2010), os quais, supostamente, favorecem a neurogênese das células-tronco (CT) neurais endógenas e o reparo tecidual (Bregman et al., 1997; Bregman et al., 1998; Tysseling et al., 2011; Jaerve et al., 2012).

Entretanto, a baixa viabilidade das células após transplante para uma área lesada, obviamente restringe a eficácia dessa promissora terapia (Hollis II e Tuszynski, 2011; Oh et al., 2011). Imediatamente após o trauma, as CT transplantadas se deparam com um microambiente isquêmico, com pouca oferta de nutrientes essenciais e oxigênio para um metabolismo adequado, o que diminui sua sobrevivência e limita seus efeitos neuroprotetores (Bregman et al., 1997; Oh et al., 2011).

Portanto, espera-se que a utilização de um fármaco neuroprotetor, como o dantrolene, diminua a apoptose e preserve o tecido neural após a indução do TMA, seja por inibição de fatores pró-apoptóticos (Caspase-3, Caspase-9 e Bax), estímulo de fatores antiapoptóticos (Bcl-2 e Bcl-x1) e de fatores neurotróficos (BDNF e NT-3). Isso resultaria em um microambiente mais propício para a sobrevivência das CT transplantadas, determinando em melhoria da ação reparadora promovida por elas.

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos avaliar os efeitos do dantrolene, das CTM e da associação de ambos no tratamento de ratos Wistar submetidos ao trauma contusivo / compressivo grave da medula espinhal e observados durante 30 dias. Para tanto, foram definidos como objetivos específicos:

- Avaliar, por meio de testes comportamentais, a recuperação funcional dos animais frente aos diferentes tratamentos;
- Avaliar alterações anatomopatológicas sistêmicas e na medula espinhal, consequentes do trauma e / ou dos efeitos dos tratamentos;
- Avaliar por imunistoquímica se os tratamentos influenciam na preservação e viabilidade neuronal da medula espinhal;
- Avaliar se o modelo de trauma medular proposto é capaz de promover alterações na expressão gênica de proteínas pró-apoptóticas (caspase-3, caspase-9 e Bax), antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x1) e de fatores neurotróficos (BDNF e NT-3) na medula espinhal;
- Avaliar se há influência dos tratamentos sobre a expressão gênica de proteínas pró-apoptóticas (caspase-3, caspase-9 e Bax), antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x1) e de fatores neurotróficos (BDNF e NT-3) na medula espinhal.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

As espécies domésticas e humana são frequentemente acometidas por afecções neurológicas, dentre as quais o trauma da medula espinhal é uma das mais frequentes. Muitas dessas situações quando não comprometem a qualidade de vida, acabam evoluindo para a morte ou eutanásia do paciente acometido (Bergman et al., 2000; Chacón e Nieto-Sampedro, 2005).

O trauma medular é causado por fatores extrínsecos e/ou intrínsecos e pode resultar em lesão na coluna vertebral, na medula espinhal ou em ambas. Os fatores extrínsecos incluem atropelamentos, quedas, chutes e pisoteios, mordidas e armas de fogo e, comumente, acarretam em fratura ou luxação vertebral. As causas intrínsecas compreendem protrusão e extrusão do disco intervertebral, malformação vertebral, fraturas patológicas devido à osteopenia, osteomielite e volumes compressivos extramedulares como abscessos e neoplasias (Summers et al., 1995; Torres et al., 2010b).

As afecções agudas e crônicas da medula espinhal são síndromes clínico-patológicas distintas, com diferentes sinais clínicos, graus de lesão e tempo de recuperação (Fehlings e Tator, 1995; Kim et al., 2013). Por isso, o tipo de trauma é um fator importante na avaliação da lesão (Delamanter et al., 1995). Uma compressão gradual lenta tem prognóstico mais favorável que uma compressão aguda, pois possibilita a acomodação da medula espinhal e, portanto, a disfunção neurológica inicial é menor. Nesse caso, geralmente, não há hemorragia aguda e necrose, e a função espinhal permanece parcialmente preservada (Summers et al., 1995). Clinicamente, o trauma crônico é caracterizado por déficit neurológico lentamente progressivo, diminuição da propriocepção e parestesia, algumas vezes intercalados por períodos de normalidade. A substância branca é a principal estrutura acometida com desmielinização e perda dos axônios (Summers et al., 1995).

A recuperação neurológica após uma compressão crônica é proporcional ao tempo de duração e, portanto, a descompressão precoce propicia melhores chances de reparação. Ocorre associação entre o tempo de compressão e a extensão dos danos e, dependendo do grau e duração da compressão, a lesão pode se tornar permanente (Delamanter et al., 1995; Fehlings e Tator, 1995; Summers et al., 1995; Kim et al., 2013).

As lesões agudas são acompanhadas por hemorragia, reação inflamatória e edema, que começam na substância cinzenta e, em poucas horas, se estendem até a substância branca e segmentos medulares adjacentes (Carlson et al., 1998; Qiao et al., 2006). A substância cinzenta é

mais sensível ao trauma agudo e à isquemia que a substância branca (Summers et al., 1995).

Apesar de intensamente estudado, o completo mecanismo que sucede a lesão primária no TMA ainda não foi totalmente elucidado. Acredita-se que o conhecimento profundo de tais mecanismos possa proporcionar uma base para o desenvolvimento e implementação de uma terapia racional e bem sucedida (Fehlings e Tator, 1995).

### **3.1 Fisiopatogenia do trauma medular agudo**

#### **3.1.1 Eventos primários**

A transferência de um impacto mecânico para a medula espinhal que resulte em ruptura de vasos sanguíneos, corpos neuronais, axônios e lesão de demais células nervosas é considerada a causa da lesão primária na medula espinhal. A gravidade das alterações histológicas varia proporcionalmente com a magnitude do trauma inicial (Delamanter et al., 1995; Fehlings e Tator, 1995).

A lesão primária não pode ser evitada e, em seu estágio agudo, ocorre ruptura da barreira hematoencefálica e dos vasos sanguíneos locais. A injúria vascular gera hemorragia, edema e isquemia locais e, na presença de hipóxia e hipoglicemia, o metabolismo torna-se anaeróbico, instaurando-se acidose láctica. O conjunto desses eventos resulta em necrose hemorrágica e / ou isquêmica central da substância cinzenta que se inicia dentro de aproximadamente quinze minutos após o trauma. A degeneração neuronal é observada por volta de uma a quatro horas, e edema e tumefação axonal focal ocorrem na substância branca após cerca de quatro a oito horas (Jeffery e Blackmore, 1999; Bergman et al., 2000). Dependendo da gravidade da lesão, a necrose pode se estender cranial e / ou caudalmente, formar cavitações císticas centrais e, em alguns casos mais graves, toda a medula se torna necrótica e sofre liquefação, sendo sua estrutura mantida apenas pelas meninges (Summers et al., 1995).

As razões para o envolvimento preferencial da substância cinzenta não foram ainda totalmente esclarecidas. Contudo, a disposição anatômica e compactação das substâncias branca e cinzenta

provavelmente são fatores contributivos. Em contraste com as fibras intimamente compactadas da substância branca, os neurônios e seus processos axonais estão frouxamente dispostos e, portanto, são mais facilmente separados pela hemorragia e pelo edema. Além disso, a predominância de hemorragias na substância cinzenta pode ser explicada pela grande rede capilar, altamente susceptível ao trauma mecânico. O aumento na pressão intramedular espinhal pós-traumática também concentra-se centralmente, predispondo esta área à lesões mais intensas. A maior demanda metabólica da substância cinzenta em comparação a substância branca é fator adicional para sua maior susceptibilidade ao trauma, particularmente durante os períodos de isquemia (Jeffery e Blackmore, 1999; Qiao et al., 2006).

As alterações vasculares produzem diminuição do aporte de adenosina-trifosfato (ATP) gerando disfunção de processos dependentes de energia, como a bomba de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), responsável pela preservação da homeostase celular. Concomitantemente, o edema que comprime os tecidos produz variação anormal nas concentrações de eletrólitos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) no líquido intersticial. Tais alterações podem interferir na excitabilidade e transmissão sináptica, o que justifica a possível interrupção da condução do estímulo nervoso imediatamente após o trauma (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005).

Seguindo-se à lesão vascular, instauram-se processos inflamatório e imunológico que inibem a reparação axonal (Delamanter et al., 1995). As respostas imunomediadas envolvem componentes celulares (neutrófilos, macrófagos e células T) e componentes não celulares (citocinas, quimiocinas e prostaglandinas) (Carlson et al., 1998; Qiao et al., 2006). Aproximadamente três a seis horas após o trauma, o local é invadido por neutrófilos, que secretam enzimas líticas e citocinas, as quais podem, futuramente, danificar o tecido e recrutar outras células inflamatórias. Monócitos e macrófagos são recrutados e a micróglia residente no local é ativada. Essas células contêm lisossomos e vacúolos apresentando aspecto espumoso (células Gitter) que iniciam o processo de fagocitose do tecido lesionado e subsequente formação de cavitações. Essas e outras células reativas produzem citocinas, como fator de

necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas e interferons que, além de mediadores da resposta inflamatória, também podem contribuir para futuros danos teciduais (Carlson et al., 1998; Lu et al., 2000; Beattie, 2004; Kwon et al., 2004; Qiao et al., 2006; Tysseling et al., 2011).

A redução do fluxo sanguíneo para o segmento lesionado pode ainda ser ocasionada por alteração anatômica do canal vertebral, hemorragia, edema, e redução da pressão sistêmica, que acarretam lesão medular adicional, denominada lesão secundária. Dessa forma, a produção e o acúmulo de metabólitos resultantes de necrose tecidual (devido ao impacto primário) e o desequilíbrio de eletrólitos intra e extracelulares, ocasionados pela redução do fluxo sanguíneo local, podem provocar a morte de células nervosas e de axônios que não foram inicialmente lesionados, inclusive em áreas distantes do ponto de impacto mecânico inicial (Beattie, 2004; Goldberg, 2003; Kwon et al., 2004).

### 3.1.2 Eventos secundários

A fisiopatologia da lesão secundária é complexa e ainda não está completamente esclarecida. Entretanto, sabe-se que ocorre uma cascata de mecanismos bioquímicos, moleculares, intra e extracelulares desencadeada pela necrose inicial que sinaliza as células adjacentes à apoptose. A morte celular por apoptose pode ser detectada horas, dias e até semanas após a injúria medular inicial, e ocorre em diversos tipos celulares, incluindo neurônios, células da glia e células inflamatórias, dentre elas neutrófilos, micróglia e macrófagos (Carlson et al., 1998; Lu et al., 2000; Mattson, 2000; Kwon et al., 2004; Genovese et al., 2006; Qiao et al., 2006).

A transmissão sináptica é dependente de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais apresentam papel primordial na regulação da permeabilidade dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  durante a excitação neuronal, atuando ainda no controle das atividades de enzimas e no armazenamento e liberação dos neurotransmissores em suas respectivas vesículas sinápticas (Moddy e MacDonald, 1995; Choi et al., 2003; Orrenius et al., 2003; Chacón e Nieto-Sampedro, 2005).

Imediatamente após o trauma, ocorre despolarização induzida mecanicamente

acompanhada pela abertura dos canais iônicos dependentes de voltagem. Isso permite massiva liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato, mais importante neurotransmissor excitatório do SNC (Moddy e MacDonald, 1995; Nakayama et al., 2002; Xu et al., 2008).

O glutamato atua por meio da ligação à proteínas receptoras específicas denominadas receptores glutamatérgicos, os quais são divididos em dois grandes grupos de acordo com suas estruturas e mecanismos de ação (Moddy e MacDonald, 1995). Os receptores ionotrópicos estão associados a canais iônicos e, quando ativados, permitem a entrada de cátions ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ ) na célula, causando despolarização de membrana neuronal. Já os receptores metabotrópicos estão associados a proteínas G, agindo por meio de sinalização intracelular por mensageiros (Scarlsbrick et al., 1999; Gepdiremen et al., 2001).

Os receptores ionotrópicos são subdivididos em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiônico (AMPA) e kainato (Scarlsbrick et al., 1999; Gepdiremen et al., 2001; Nakayama et al., 2002). Embora a ativação dos receptores AMPA e kainato resulte em influxo de  $\text{Na}^+$  do meio extracelular, alguns subtipos podem ainda ser permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Em contraste, os receptores NMDA são responsáveis principalmente pela entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula (Mody e MacDonald, 1995; Xu et al., 2008).

Em circunstâncias normais o glutamato é rapidamente removido da fenda sináptica por mecanismos existentes nos neurônios pré-sinápticos e nos astrócitos vizinhos, que interrompem sua ação. Entretanto, quando ocorre uma lesão medular aguda, a concentração extracelular de glutamato se torna elevada, causando superestimulação de receptores excitatórios e elevação das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  intracelulares, predispondo à toxicidade e morte neuronais (Crowe et al., 1997; Beattie, 2004; Wei et al., 2002). Essa lesão neuronal permite a liberação e manutenção de mais glutamato no espaço extracelular perpetuando a cascata degenerativa, conhecida como excitotoxicidade (Mody e MacDonald, 1995; Xu et al., 2008).

O desequilíbrio do  $\text{Na}^+$  também contribui na fisiopatologia da lesão medular, em particular nas lesões de axônio e de componentes da glia. O aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular ocorre por meio do influxo realizado pelos canais dependentes de voltagem, daqueles associados aos receptores de glutamato, além da troca  $\text{Ca}^{2+} / \text{Na}^+$ , na qual o  $\text{Ca}^{2+}$  é transportado para fora da célula em troca de  $\text{Na}^+$ . O seu acúmulo e, conseqüentemente, o de água no interior dos axônios os levam a morte (Martins et al., 2011; Wu et al., 2013).

Como citado anteriormente, o acúmulo do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ocorre por meio do influxo realizado pelos canais dependentes de voltagem e pelos canais associados aos receptores NMDA (Mody e MacDonald, 1995). Além disso, o incremento intracelular deste íon pode ocorrer, principalmente, pela ativação dos receptores metabotrópicos, que estimulam o metabolismo de fosfolípidios de inositol. Esses, por sua vez, são responsáveis pela mobilização de reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  ao estimularem os receptores rianodina (RyR) nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Por outro lado, os receptores metabotrópicos inativam os transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de energia, cuja função é bombear o  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático através da membrana celular, ou sequestrar o mesmo para dentro de compartimentos, como mitocôndria e retículo endoplasmático, mantendo assim esse íon em altas concentrações citoplasmáticas (Kuwana e Newmeyer, 2003).

O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intra-axonal inicia-se cerca de 30 minutos após a lesão e, aproximadamente oito horas depois, atinge seu valor máximo, podendo permanecer em elevadas concentrações por uma semana (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005). Tal acúmulo permite desencadear uma amplitude de processos  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes, os quais alteram letalmente o metabolismo celular dos neurônios remanescentes. Esses processos incluem:

- 1) Disfunção da fosforilação oxidativa mitocondrial, levando a falência do metabolismo aeróbico e acúmulo de ácido láctico;
- 2) Ativação de óxido nítrico sintetase mitocondrial e citoplasmático, e produção de óxido nítrico;

- 3) Ativação de fosfolipases C e  $\text{A}_2$  que alteram as membranas celulares liberando ácidos graxos poli-insaturados e produzindo ácido araquidônico, o qual será convertido pelas enzimas cicloxigenases (COX 1 e 2) e lipoxigenases (LOX). As COX convertem o ácido araquidônico em prostanoídeos deletérios, como as potentes prostaglandinas vasoconstritoras e os tromboxanos, que são vasoconstritores e promotores de agregação plaquetária. As LOX convertem o ácido araquidônico em leucotrienos, quimiotáticos para leucócitos polimorfonucleares e macrófagos;
- 4) Formação de radicais livres de oxigênio (RLO), os quais promovem alterações estruturais em proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídeos, permitindo a formação de lipoperóxidos que destroem as membranas celulares;
- 5) Ativação de receptores opiáceos, que contribuem para disfunção vascular, e distúrbios iônicos e metabólicos;
- 6) Ativação das calpaínas e caspases, que são proteases de cisteína dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  que modulam diversos substratos, incluindo proteínas citoesqueléticas e contribuem para a transdução do sinal apoptótico (Bergman et al., 2000; Lu et al., 2000; Mattson, 2000; Kwon et al., 2004; Genovese et al., 2006).

Devido à disfunção mitocondrial originada pelo excesso de  $\text{Ca}^{2+}$ , ocorre aumento da permeabilidade de sua membrana e conseqüente liberação do citocromo c para o citoplasma (Mody e MacDonald, 1995; Wei e Perry, 1996; Wei et al., 2000). Esse processo é regulado pelas proteínas da família Bcl-2, responsáveis pela inibição (Bcl-2 e Bcl-x1) ou propagação (Bax) do sinal apoptótico (Li et al., 1996; Kluck et al., 1997; Choi et al., 2003; Kuwana e Newmeyer, 2003; Seki et al., 2003). Essas proteínas estão presentes, predominantemente, nas membranas mitocondriais (Lou et al., 1998; Kuwana e Newmeyer, 2003), e previnem a morte celular



por meio da supressão da peroxidação lipídica e estabilização da membrana mitocondrial (Choi et al., 2003; Seki et al., 2003). Com isso, evitam o colapso do potencial de membrana mitocondrial, bloqueiam a liberação do citocromo c e consequente ativação das vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose (Kluck et al., 1997; Kuwana e Newmeyer, 2003; Kotipatruni et al., 2011).

Quando liberado, o citocromo c desencadeia a via intrínseca da apoptose por meio da ativação da caspase-9 e, em seguida, da caspase-3. Já a via extrínseca é estimulada por citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  que, ao se ligarem a seus receptores na membrana celular, ativam a caspase-8, que por sua vez, também resulta na ativação da caspase-3 (Mattson, 2000; Tagaki et al., 2003). A caspase-3 é a via final comum, responsável por sinalizar a célula para apoptose (Springer et al., 2000; McEwen e Springer, 2005; Springer et al., 2009).

A morte de neurônios e oligodendrócitos interfere com a condução sináptica e induz degeneração da mielina (Crowe et al., 1997; Beattie, 2004; Xu et al., 2008). No local da lesão há ruptura do axônio, cujo segmento distal, que fica isolado de seu respectivo corpo neuronal, sofre degeneração. O segmento proximal sobrevive, mas falha em crescer novamente para reinervar seu alvo, e sofre hipotrofia. O processo de degeneração do axônio e seu estrato mielínico distalmente ao ponto de separação do corpo celular neuronal é denominado degeneração Walleriana (Mattos, 2000; Bergman et al., 1997). A degeneração dessas estruturas resulta numa série de segmentos ovoides, conhecidos como elipsoides, que são gradualmente removidos por macrófagos, deixando vacúolos residuais por toda a substância branca (Liu et al., 1997; Radojicic et al., 2005).

A distribuição anatômica dessas alterações na medula espinhal reflete a organização das vias aferentes (sensitiva - corpos celulares situados caudalmente a lesão) e eferentes (motoras - corpos celulares situados cranialmente a lesão) da medula espinhal. Os vacúolos e axônios em processo de degeneração são mais evidentes nas colunas dorsolaterais (principalmente aferentes), cranialmente à lesão, e nas colunas ventrolaterais (principalmente eferentes), caudalmente à lesão. Nas proximidades do local traumatizado, as

terminações axonais ainda aderidas ao corpo celular tornam-se distendidas com o axoplasma formando balões axonais (Jeffery e Blackemore, 1999; Lu et al., 2000).

A partir de quatro horas depois do trauma, as células neuronais e gliais apoptóticas são detectadas pela imunistoquímica, com picos em oito e 24 horas, respectivamente (Lu et al., 2000). Dentro de sete dias ocorre aumento progressivo da área lesada e as cavitações aumentam com mais morte neuronal e glial. Um terceiro pico de apoptose, dessa vez de oligodendrócitos, é detectado no sétimo dia e está associado com agravamento da degeneração axonal. Os oligodendrócitos tardiamente mortos reduzem a possibilidade de remielinização após lesão axonal. Existem indícios de que os axônios quando alterados não produzem estímulo para sobrevivência dos oligodendrócitos, ou seja, estes dependeriam dos axônios intactos para sobreviver (Li et al., 1996; Radojicic et al., 2005; Xu et al., 2008).

No período de uma a quatro semanas já estão presentes áreas bem demarcadas de cavitações dentro das substâncias branca ou cinzenta, degeneração Walleriana extensa, e tecido cicatricial preenchido por astrócitos, outras células da glia, e até por fibroblastos, representando os estágios finais da evolução histopatológica da lesão medular (Beattie, 2004; Radojicic et al., 2005).

### **3.1.3 Resposta do organismo frente ao trauma**

Sabe-se que no SNC adulto, a capacidade de regeneração celular, embora presente, é limitada. Alterações nas propriedades intrínsecas neuronais e nas características do microambiente local, após o TMA, contribuem sobremaneira para diminuir ainda mais a capacidade de renovação do SNC adulto (Coumans et al., 2001). Além disso, as células-tronco (CT) que estão presentes na medula espinhal do animal adulto, são ineficazes na substituição do tecido danificado após o TMA (Coutts e Keirstead, 2008; Xu et al., 2012).

Uma combinação de fatores é responsável pela restrição à regeneração axonal e recuperação funcional após o TMA, os quais também atuam na inibição da função das CT endógenas,

progenitores neurais e neurônios maduros dentro do SNC adulto (Coumans et al., 2001; Schwab, 2002; Coutts e Keirstead, 2008; Xu et al., 2012).

Estes fatores incluem a proliferação e hipertrofia astrocítica, denominada astrocitose ou gliose reativa, responsável pela produção da cicatriz glial, na tentativa de impedir a progressão da lesão, mas que acaba atuando como uma barreira que impede o crescimento axonal. Além disso, a falta de fatores neurotróficos, acúmulo de proteoglicanos sulfatados inibitórios, moléculas inibitórias associadas à degradação da mielina, diminuição dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina e da incompetência dos progenitores prejudicam a capacidade regenerativa neural (Schwab, 2002; Barnabé-Heider e Frisén, 2008; Coutts e Keirstead, 2008; Rooney et al., 2009a).

As intervenções que aumentem a sobrevivência neuronal ou reduzam a exposição dos axônios aos fatores inibitórios podem melhorar a capacidade de renovação neural após o TMA. Analisando as estratégias que visam promover o crescimento dos axônios por meio da modulação dos mecanismos intrínsecos ou extrínsecos, a plasticidade axonal pode ser dividida em duas categorias principais: 1) regeneração e 2) brotamento de colaterais. Regeneração refere-se ao novo crescimento da extremidade axonal que foi interrompida no local da lesão. Brotamento, em contrapartida, se refere ao crescimento axonal que surge a partir de outro axônio que se manteve preservado nas adjacências da lesão, na tentativa de restabelecer a conexão que foi perdida (Coumans et al., 2001; Hollis II e Tuszynski, 2011; McCall et al., 2012).

### **3.2 Tratamento farmacológico do trauma medular agudo**

Como o trauma primário não pode ser evitado e tampouco amenizado com tratamento farmacológico, os mecanismos secundários têm sido alvos de tais terapias. Cada agente terapêutico atua sobre um ou mais mecanismos da lesão secundária, objetivando conferir neuroproteção e / ou restauração do tecido lesionado. Já foi demonstrada capacidade de controle voluntário da movimentação em animais com apenas 5% a 10% de axônios íntegros no foco da lesão, o que justifica os esforços para preservação ou restauração do

tecido neuronal lesionado (Eidelberg et al., 1977; Fehlings e Tator, 1995).

#### **3.2.1 Corticoterapia**

Os glicocorticoides (GC) têm sido exaustivamente utilizados em trauma medular por suas diversas ações moduladoras presuntivas sobre os mecanismos secundários da lesão. Embora seus efeitos protetores sejam, na prática, alvos de controvérsia, esses fármacos ainda são amplamente empregados (Dinkel et al., 2003; Torres, 2013b).

Quanto aos benefícios da liberação endógena basal, os GC inibem a peroxidação lipídica produzida por RLO, reduzem o edema vasogênico, modulam a resposta inflamatória, mantêm fluxo sanguíneo e o metabolismo aeróbico, e evitam acúmulo de  $Ca^{2+}$  intracelular. Entretanto, na presença de isquemia, os GC deixam neurônios mais vulneráveis aos insultos metabólicos, pela inibição da captação de glicose, elevação das concentrações de ácido láctico e exacerbação da cascata de excitotoxicidade, potencializando a morte neuronal e impedindo a remielinização de neurônios lesionados (Dinkel et al., 2003; Tsutsumi et al., 2006; Torres, 2013b).

Além da inibição da remielinização, supressão do sistema imunológico e susceptibilidade às infecções, ulceração do trato gastrointestinal (TGI), pancreatite, hipertensão, diabetes, coagulopatias, tromboembolismos e retardo da cicatrização estão entre os principais efeitos deletérios, possivelmente relacionados à inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pela suplementação exógena de GC (Matsumoto et al., 2001; Torres, 2013b).

Por isso, o uso de GCs tem sido contraindicado em afecções traumáticas. Estudos clínicos randomizados do uso em trauma crânio-encefálico (CRASH) e trauma medular (NASCIS) demonstraram maiores taxas de sepse grave, pneumonia, hiperglicemia, complicações do TGI e aumento da mortalidade em pacientes humanos (Edwards et al., 2005; Sayer et al., 2006).

### 3.2.2 Outras classes farmacológicas já estudadas

Diversas outras classes terapêuticas vem sendo estudadas há décadas, e suas possíveis propriedades e principais agentes investigados estão sumarizados na tabela 1. Esses fármacos

apresentaram alguma resposta neuroprotetora quando estudados em ensaios *in vitro*, porém, existe uma grande dificuldade na aplicação de tais resultados em estudos clínicos (Bergman et al., 2000; Dumont et al., 2001; Kwon et al., 2004).

**Tabela 1 - Fármacos com potenciais efeitos neuroprotetores estudados para terapia do trauma medular**

Classe farmacológica	Fármacos e propriedades investigadas	Referências
Outros hormônios esteroides	Progesterona: prevenir excitotoxicidade, modular ação do GABA e dos receptores NMDA, diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica, propriedades antioxidantes.	Fee et al., 2007
Hormônios peptídicos	Hormônio liberador de tirotropina e análogos: ação anti-inflamatória, antioxidante e estabilizador de membranas celulares, antagonizar os efeitos autodestrutivos dos opioides endógenos, do fator ativador de plaquetas, dos leucotrienos, e dos aminoácidos excitatórios. Aumentar o fluxo sanguíneo medular, restaurar o equilíbrio iônico e o estado bioenergético celular.	Pitts et al., 1995
Antioxidantes e varredores de RLO	Ácido retinoico (vitamina A), $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), selênio e ubiquinonas (coenzima Q): prevenir peroxidação lipídica e varrer RLO.	Anderson et al., 1988
Moduladores do metabolismo do ácido araquidônico	Anti-inflamatórios não-esteroidais: inibir as COX e as LOX; aumentar o fluxo sanguíneo medular, diminuir a formação de RLO, impedir a agregação plaquetária e modular a resposta inflamatória.	Resnick et al., 1998
Antagonistas de receptores glutamatérgicos	MK801 e gaciclidina (GK11): modular transmissão sináptica glutamatérgica, diminuir excitotoxicidade e reduzir perda de células gliais na substância branca.	Faden et al., 1988.
Bloqueadores de canais de Na <sup>+</sup>	Tetrodotoxina e riluzol: preservar substância branca e cinzenta.	Martins et al., 2011; Wu et al., 2013
Sais inorgânicos	Sulfato de magnésio: prevenir excitotoxicidade, inibir apoptose, diminuir peroxidação lipídica, aumentar taxa bioenergética celular.	Kaptanoglu, et al., 2003
Compostos organosulfurados	DMSO: diminuir edema, vasodilatador, anti-inflamatório, varredor de RLO, inibidor de agregação plaquetária, bloqueador de canais de Ca <sup>2+</sup> e facilitador de regeneração da fibra nervosa.	Kajihara et al., 1973
Lazaroides (21-aminosteroides)	Mezilato de tirilazade: antioxidantes, aumentar estabilidade de membranas, inibir peroxidação lipídica, aumentar o fluxo sanguíneo, varredor de RLO, modular degradação do ácido araquidônico.	Hall, 1988
Antagonistas de receptores opioides	Naloxona: reverter hipotensão, aumentar o fluxo sanguíneo medular, reduzir o influxo de Ca <sup>2+</sup> celular, aumentar a concentração de magnésio livre e a taxa bioenergética celular, modular a liberação de aminoácidos excitatórios.	Olsson et al., 1995
Gangliosídeos	GM-1: acelerar o crescimento da placa neurítica, estimular a regeneração do axônio, atenuar a excitotoxicidade, prevenir a progressão apoptótica, regular a proteína quinase C, aumentando assim a plasticidade da função neurológica do paciente.	Geisler et al., 1991;

Adaptado de Dumont et al. (2001), Torres (2008) e Torres et al. (2010b).

### 3.2.3 Bloqueadores de canais de cálcio

#### *Dantrolene*

O dantrolene sódico foi originalmente sintetizado por Snyder e seus colaboradores em 1967 (Snyder et al., 1967). Esse fármaco é um derivado da hidantoína que bloqueia a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático impedindo a excitação-contração do músculo esquelético. Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição dos RYR presentes no retículo endoplasmático, responsáveis pelo controle do efluxo de  $Ca^{2+}$  para o citoplasma. Esses receptores estão presentes em diversos tecidos sob três isoformas distintas, sejam elas RYR1 presentes nos músculos esqueléticos, RYR2 presentes no músculo cardíaco, e RYR3 presentes no tecido nervoso, sendo que o dantrolene age somente sobre RYR1 e RYR3 (Krause et al., 2004; Paul-Pletzer et al., 2005).

Devido a suas propriedades miorrelaxantes e ausência de influência cardiovascular, é o medicamento de eleição na profilaxia e tratamento do hipermetabolismo grave do músculo esquelético, característico da hipertermia maligna. Também se utiliza em outros estados hipercatabólicos como na síndrome neuroléptica maligna, e em espasticidade muscular de diferentes origens, sejam elas esclerose múltipla, paralisia cerebral ou lesão medular (Krause et al., 2004).

Após sua administração, o dantrolene liga-se de forma rápida e reversível às proteínas plasmáticas, principalmente albumina, e mantém-se em concentrações plasmáticas estáveis durante aproximadamente cinco horas. Posteriormente, é metabolizado pelo fígado principalmente em 5-hidroxi-dantrolene, com metade da potência do fármaco original e em metabólitos menores e inativos (Kim et al., 2011). Sua eliminação é feita pelos rins e pela bile. O tempo de meia vida do dantrolene foi estimado em 12 horas e de seu metabólito maior, em torno de 15 horas. A LD50 após a injeção intraperitoneal de dantrolene foi de 780 mg/kg em ratos (Ellis e Carpenter, 1974; Fournier, 1982; Ward et al., 1986; Krause et al., 2004).

O dantrolene apresenta-se como um fármaco seguro e com mínimos efeitos colaterais quando utilizado em doses terapêuticas em humanos

(Krause et al., 2004; Kim et al., 2011), gatos (Bowman et al., 1979), aves (Silverman e Hikida, 1977), suínos (Harrison, 1998), equinos (Edwards et al., 2003), cães, coelhos, ratos, camundongos e hamsters (Fournier, 1982; Ward et al., 1986; Torres, 2008). Os efeitos indesejáveis podem ocorrer com a administração de dose única excessiva ou crônica por uso prolongado. Ao iniciar o tratamento em humanos foram ocasionalmente relatados sintomas de euforia, tonturas, sonolência e fadiga, ainda que de forma transitória. Hepatotxicidade, debilidade muscular, flebite, e falha respiratória foram os achados mais consistentes com tratamentos crônicos e / ou doses elevadas (Brandom e Larach, 2002; Krause et al., 2004; Kim et al., 2011).

Hotchkiss et al. (1995) demonstraram, em um modelo de endotoxina utilizando camundongos, que o dantrolene pode ser eficaz em tratar distúrbios inflamatórios mediados por citocinas. Büyükokuroglu (2002), em estudos com ratos e camundongos, afirmou que o dantrolene apresenta propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas, sendo capaz de diminuir consideravelmente a formação de edema e inibir a síntese de metabólitos do ácido araquidônico. Além disso, Gülçin et al. (2004) demonstraram que o dantrolene, após uma hora do momento da aplicação, é capaz de diminuir a atividade da enzima anidrase carbônica de forma sistêmica, atuando na correção de alcalose metabólica, na redução de edemas e de glaucoma e no controle do *status epilepticus*, além de apresentar propriedades antiulcerogênicas já relatadas também por Büyükokuroglu et al. (2002).

Também foram comprovadas suas propriedades antioxidantes por prevenir a peroxidação lipídica e proteger as células contra os efeitos tóxicos dos RLO (Büyükokuroglu et al., 2001; Büyükokuroglu et al., 2002; Ucuncu et al., 2005).

O dantrolene apresenta efeito benéfico sobre o esvaziamento vesical em pacientes com retenção urinária subsequente a lesão medular cranial a região sacral (Torres et al., 2011). Esse fármaco atua no relaxamento da musculatura estriada esquelética do esfíncter uretral externo diminuindo assim, a resistência ao esvaziamento vesical, auxiliando no controle miccional (Khalaf et al., 1979; Hackler et al., 1980; Torres et al., 2011).

### 3.3 Tratamento com células-tronco

Diversos estudos demonstram os efeitos neuroprotetores do dantrolene em modelos de morte neuronal. Após lesão hipocampal induzida por isquemia transitória, foi capaz de prevenir a liberação excessiva das reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Wei e Perry, 1996; Yano et al., 2001), reduzir as concentrações de glutamato extracelular (Nakayama et al., 2002) e diminuir o número de células apoptóticas (Li et al., 2005). Em modelos de lesão produzida por excitotoxicidade em culturas de neurônios granulares de cerebelo de ratos, o dantrolene não permitiu a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela estimulação dos receptores NMDA (Gepdiremen et al., 2001; Makarewicz et al., 2003; Düzenli et al., 2005).

Foi sugerido também, efeito antiepiléptico do dantrolene em modelos de lesão cerebral em ratos, induzida por *status epilepticus* eletrogênico (Niebauer e Gruenthal, 1999). Yoshida e Sakai (2006) afirmam que a inibição das crises epiléticas ocorre devido ao impedimento da liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares, provocado pelo dantrolene. Popescu et al. (2002) estudaram a morte celular apoptótica induzida pela ação epilética do ácido kaínico em culturas de células granulares cerebelares (*in vitro*) e em neurônios cerebrais (*in vivo*) de ratos e relataram que o dantrolene foi capaz de diminuir significativamente a apoptose neuronal.

Existem poucos estudos dos efeitos do dantrolene no tratamento de lesões à medula espinhal. Seus efeitos neuroprotetores já foram demonstrados em modelo *in vitro* de TMA (Thorell et al. 2002) e em modelo de lesão por isquemia e reperfusão (Kocogullari et al. 2008). Um estudo *in vivo* de trauma medular em coelhos mostrou seus efeitos benéficos contra o estresse oxidativo, diminuindo a morte neuronal (Aslan et al. 2009). Finalmente, seu efeito neuroprotetor em modelo contusivo/compressivo de TMA *in vivo*, foi primeiramente demonstrado por Torres et al. (2010a). Nesse estudo, o dantrolene mostrou-se como um potente fármaco antiapoptótico, preservando neurônios nas adjacências do epicentro da lesão, diminuindo o número de células TUNEL-positivas e de células expressando caspase-3.

Há uma expectativa crescente de que as terapias com CT possam oferecer benefícios substanciais para os pacientes acometidos por TMA. Entretanto, seu uso em doenças neurodegenerativas ainda tem um longo caminho a percorrer até que tais benefícios sejam clinicamente comprovados. Dentre as CT já estudadas para tratamento do TMA, estão as células-tronco mesenquimais (CTM) (Ankeny et al., 2004; Ohta et al., 2004; Himes et al., 2006; Caldeira, 2011), neurais (Takeuchi et al., 2007; Oh et al., 2011; Xu et al., 2012), fibroblastos (Mitsui et al., 2005; Tobias et al., 2003), CT da bainha olfatória (Lu et al., 2006) e células de Schwann (Pearse et al., 2007), além das células-tronco embrionárias (CTE) (Brüstle et al., 1999, Yoneyama et al., 2011)

Diversas questões ainda precisam ser esclarecidas: Qual o melhor tipo celular a ser utilizado? Qual a melhor via de aplicação? São capazes de permanecer no local onde foram implantadas, sem migrar para regiões indesejadas? Podem se integrar e se diferenciar quando implantadas no SNC lesionado? Há riscos de proliferação incontrolável nos tecidos implantados? Quais seriam seus efeitos deletérios em longo prazo? Podem sobreviver indefinidamente nos locais implantados? Estas e outras perguntas vem sendo alvo de incessantes pesquisas clínicas e experimentais. Algumas já foram respondidas, outras permanecem inconclusivas e sob intensa investigação (Fortier, 2005; Barnabé-Heider e Frisén, 2008; Coutts e Keirstead, 2008; Caldeira, 2011; Eggenhofer et al., 2012; Shin et al., 2013; Torres, 2013a; Oliveri et al., 2014).

As CT são definidas como células progenitoras indiferenciadas, com capacidade de autorrenovação por meio de replicação, bem como diferenciação em linhagens celulares específicas de vários tecidos do corpo (Fortier, 2005; Barnabé-Heider e Frisén, 2008). São classificadas de acordo com sua origem em embrionárias e adultas e, de acordo com sua capacidade de diferenciação em totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes (Barnabé-Heider e Frisén, 2008; Coutts e Keirstead, 2008; Torres, 2013a).

Dentre os tipos mais estudados para reparação neurológica estão: (1) CTE, obtidas a partir de um embrião na fase de blastocisto, as quais são capazes de propagação prolongada *in vitro*, mantendo a capacidade para gerar todas as linhagens somáticas, incluindo o tecido nervoso (Brüstle et al., 1999; Yoneyama et al., 2011); (2) CT adultas, presentes nos tecidos fetais ou de indivíduos adultos, são responsáveis pela reparação e manutenção desses tecidos e apresentam capacidade limitada de diferenciação, como é o caso das CTM (Pittenger et al., 1999). Este também é o caso das células-tronco neurais (CTN), que foram identificadas e expandidas a partir do sistema nervoso e permitiram o avanço da medicina restaurativa frente às doenças neurológicas (Takeuchi et al., 2007; Oh et al., 2011; Xu et al., 2012).

Inicialmente, acreditava-se que as CT adultas possuíam potencial de diferenciação restrito somente às células do tecido ao qual pertenciam (Pittenger et al., 1999). Porém, diversas pesquisas tem demonstrado que algumas linhagens de CT adultas são capazes de originar tecidos diferentes de sua formação embrionária, conceito conhecido como plasticidade celular ou transdiferenciação (Woodbury et al., 2000; Safford et al., 2004; Dasari et al., 2007; Wang et al., 2008; Kang et al., 2012). A eficácia terapêutica de tais estratégias vem sendo aperfeiçoada, modificando-se geneticamente as CT para hiper ou hipoexpressão de genes de fatores de interesse específico (Liu et al., 1999; Tobias et al., 2003; Lu et al., 2005; Mitsui et al., 2005; Rooney et al., 2009b).

Os principais mecanismos de recuperação induzidos pelo transplante de CT baseiam-se na integração destas ao tecido receptor, substituindo as células neurais danificadas; proteção e regeneração do sistema nervoso, promovendo fatores de crescimento e estímulo à neurogênese endógena; e estímulo à neovascularização, provendo um substrato que permita a regeneração e desenvolvimento de CT endógenas (Ankeny et al., 2004; Fortier, 2005; Himes et al., 2006; Uccelli et al., 2011; Xu et al., 2012).

Na maioria dos estudos que relatam melhorias funcionais em modelos animais de TMA, não são observadas diferenciação e integração significativas das CT transplantadas no tecido

receptor (Ankeny et al., 2004; Himes et al., 2006; Rooney et al., 2009a; Rooney et al., 2009b). Nesses casos, as CT podem agir como carreadores ou estimular a produção endógena de fatores tróficos (He et al., 2013). Estes por sua vez, aumentam a sobrevivência e a função das células neurais, promovem diferenciação das CTN endógenas quiescentes, remielinização dos axônios e reestabelecimento dos circuitos neurais danificados (Bregman et al., 1997; Bregman et al., 1998; Zhang et al., 2010; Oh et al., 2011).

Para que a terapia com CT se torne uma opção viável na prática da medicina humana ou veterinária, é necessário que seja possível controlar sua migração, proliferação e diferenciação em fenótipos celulares específicos, para evitar complicações, como reações imunológicas, alodinia e formação de neoplasias, e permitir o reparo eficiente da lesão (Liu et al., 1999; Fortier, 2005; Eggenhofer et al., 2012; Jaerve et al., 2012; Shin et al., 2013).

### 3.3.1 Células-tronco mesenquimais

As CTM isoladas a partir do estroma da medula óssea apresentam propriedades terapêuticas promissoras (Woodbury et al., 2000; Ankeny et al., 2004; Lu et al., 2005; Osaka et al., 2010; Kang et al., 2012), e vem sendo consideradas como “gold standard” para o tratamento de TMA em ensaios pré-clínicos e clínicos (Oliveri et al., 2014). Já foram demonstradas sua capacidade em se diferenciar em células óssea, adiposa, tendínea e cartilaginosa (Pittenger et al., 1999). Existem relatos de que as CTM poderiam ainda sofrer transdiferenciação *in vivo* para células do SNC (Woodbury et al., 2000; Safford et al., 2004; Dasari et al., 2007).

As vantagens práticas do uso das CTM são sua fácil obtenção, isolamento e propagação *in vitro*, possibilidade de transplante autólogo, o que diminui as chances de rejeição imunogênica (Pittenger et al., 1999; Tropel et al., 2004; Dominici et al., 2006), e apresentam habilidade de migrar para áreas lesadas, onde está o foco da inflamação (Takeuchi et al., 2007; Caldeira, 2011; Tysseling et al., 2011; Jaerve et al., 2012; Zendedel et al., 2012). Além disso, existem evidências que demonstram ausência de imunogenicidade em caso de seu transplante alogênico (Rooney et al. 2009a; Kang et al., 2012).

Além da controversa capacidade de substituir diretamente neurônios e células gliais danificadas, as CTM podem exercer importante função suportiva na terapia do TMA. Elas podem criar um microambiente local favorável para limitar a lesão secundária e promover a regeneração axonal via imunomodulação, expressão de fatores neurotróficos, antiapoptóticos, citocinas e quimiocinas (Lu et al., 2005; Himes et al., 2006; Dasari et al., 2007; Tysseling et al., 2011; Uccelli et al., 2011; Eggenhofer et al., 2012; Shin et al., 2013), aumento da vascularização, provendo um substrato que permita o crescimento neural, e/ou suprimindo a formação de cavitações e cicatriz glial (Ankeny et al., 2004; Rooney et al., 2009a; Rooney et al., 2009b).

Adicionalmente, as CTM tem sido geneticamente modificadas, principalmente, para secreção de neurotrofinas, e transplantadas para a medula espinhal traumatizada em modelos animais experimentais (Lu et al., 2005; Rooney et al., 2009b; Sasaki et al., 2009; Zhang et al., 2010).

### 3.3.2 Fatores neurotróficos

Os fatores neurotróficos ou neurotrofinas são fatores de crescimento que controlam geração, diferenciação e manutenção de diversas populações neurais do SNC e periférico (Scarlsbrick et al., 1999; Gerin et al., 2011). São responsáveis pela proliferação de precursores neurais, sobrevivência neuronal, crescimento axonal, arborização dendrítica, regulação da sinaptogênese e liberação de neurotransmissores (Bregman et al., 1997; Bregman et al., 1998; Sasaki et al., 2009; Caldeira, 2011). Desempenham, portanto, importante função nas diferentes formas de plasticidade do sistema nervoso durante o desenvolvimento e no indivíduo adulto.

A primeira neurotrofina identificada foi o fator de crescimento do nervo (NGF), seguido do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e as neurotrofinas 3 (NT-3) e 4/5 (NT-4/5). No SNC, o BDNF e o NT-3 são amplamente expressados em neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e micróglia (Liebl et al., 2001; Qin et al., 2006; Gerin et al., 2011).

Tanto o BDNF quanto a NT-3 podem aumentar a capacidade de crescimento dos neurônios da medula espinhal, via ativação de duas classes distintas de receptores transmembranas, a tirosina cinase (Trk) e o pan neurotrofina p75NTR (Bregman et al., 1997; Bregman et al., 1998; Liebl et al., 2001; Gerin et al., 2011). O BDNF promove, principalmente, crescimento do corpo celular, por meio de ligação e ativação ao receptor de membrana TrkB, cuja sinalização mantém o crescimento e desenvolvimento de neurônios (Ikeda et al., 2001; Ikeda et al., 2002). Em contrapartida, NT-3 promove, principalmente, crescimento de placas neuríticas, por meio da ligação e ativação ao receptor TrkC, cuja sinalização é responsável pelo crescimento axonal e diferenciação de progenitores neurais em neurônios sensoriais, motores, dopaminérgicos, dentre outros (Liu et al., 1999; Tobias et al., 2003; Mitsui et al., 2005; Zhang et al., 2010; Gerin et al., 2011).

Os eventos secundários subsequentes à lesão da medula espinhal são responsáveis não somente por causar morte celular, mas também ajudam na tentativa de reestabelecer a função comprometida, aumentando, inicialmente, os níveis locais de fatores neurotróficos (Scarlsbrick et al., 1999; Ikeda et al., 2002). Tais fatores estimulam a proliferação de células progenitoras endógenas e o aumento da plasticidade e/ou regeneração axonal, o que limitaria a perda tecidual da medula espinhal após lesão (Zhou e Shine, 2003; Qin et al., 2006; Sasaki et al., 2009; Hollis II e Tuszynski, 2011; McCall et al., 2012).

Entretanto, além das reações gliais e inflamatórias secundárias que limitam a proliferação dos progenitores e do crescimento axonal, existem evidências de moléculas inibitórias do crescimento neural, presentes no SNC adulto lesionado, que contribuem para um microambiente desfavorável à regeneração axonal (Carlson et al., 1998; Schwab, 2002; Kim et al., 2010; McCall et al., 2012).

Portanto, o entendimento dos efeitos dos fatores neurotróficos sobre o crescimento regenerativo poderá fornecer ferramentas potentes para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas para pacientes que sofreram trauma à medula espinhal (Scarlsbrick et al., 1999; Gerin et al.,

2011; Hollis II e Tuszynski, 2011; McCall et al., 2012).

### 3.4 Estudo experimental das lesões medulares

Estudos experimentais visam o melhor entendimento das interações entre os mecanismos fisiopatológicos imediatamente após o trauma medular, com objetivo de intervir com novas estratégias terapêuticas que minimizem a lesão neurológica (Dumont et al., 2001; Thuret et al., 2006).

Pesquisas que envolvem trauma da medula espinhal empregam diversos modelos animais para mimetizar os mecanismos patológicos secundários a esse tipo de acometimento. O rato é a espécie mais comumente utilizada nesses estudos, pois além de ser tolerante à intensidade do trauma experimental, apresenta vantagens como fácil aquisição, baixo custo e simplicidade de manipulação. A viabilidade da sobrevivência desses animais está relacionada ao protocolo anestésico, ao procedimento cirúrgico e aos cuidados intensivos pós-operatórios, fatores esses que contribuem para uma alta taxa de sobrevivência mesmo em lesões graves (Taoka e Okajima, 1998; Ma et al., 2001; Torres et al., 2010c).

Acredita-se que os modelos de trauma realizados por contusão/compressão induzam um tipo de lesão semelhante à que acomete os animais de companhia e a espécie humana com maior frequência (Torres et al., 2010c). Modelos de TMA por laceração/transecção não representam os mecanismos de lesão por esmagamento, típicos nos animais domésticos e seres humanos, além de apresentarem limitada propagação craniocaudal dos eventos secundários (Oliveri et al., 2014).

O modelo de contusão por peso compressivo, utilizado para reproduzir o trauma medular agudo, foi proposto originalmente em cães por Allen em 1911 (Taoka e Okajima, 1998). Esse modelo mimetiza de maneira representativa o que ocorre na maioria das lesões espinhais em humanos e vem sendo modificado e aprimorado ao longo do tempo, para adequar-se às necessidades de cada grupo de pesquisadores em obter determinado padrão de lesão medular (Kwon et al., 2004). O impactador da *New York*

*University* (NYU) desenvolvido pelo Laboratório de Neurocirurgia da Universidade de Nova Iorque e descrito por Gruner (1992), é o mais utilizado para proporcionar esse tipo de contusão medular em ratos. Esse aparelho estereotáxico é conectado a um computador com software específico que registra a velocidade de queda da haste que suporta o peso sobre a medula, o momento do impacto e o grau de compressão sofrida pela medula espinhal, diminuindo, portanto, a variabilidade do trauma entre os animais (Gruner, 1992; Basso et al., 1996).

Devido à inacessibilidade a tal equipamento por parte de alguns centros de pesquisa, por ser acima de tudo oneroso, e à necessidade de reproduzir-se um trauma medular padronizado, semelhante aquele proporcionado pelo impactador NYU, com baixo custo e fácil execução, buscam-se mecanismos impactadores alternativos, como o proposto por Torres et al. (2010c). Nesse estudo, Torres et al. (2010c) utilizando um aparelho estereotáxico simples e eficiente, demonstraram que pesos compressivos de 50,5 g ou 70,5 g na 13ª vertebra torácica (T13), durante cinco minutos, eram capazes de reproduzir de maneira homogênea trauma medular de grau moderado e grave, respectivamente, em ratos.

### 3.5 Testes comportamentais para avaliação neurológica em ratos

Testes comportamentais tem sido empregados para avaliar a integridade dos tratos espinhais remanescentes e evolução da função neurológica de animais traumatizados, basicamente por meio da observação da locomoção (Basso et al., 1996; Von Euler et al., 1996; Farooque, 2000; Metz et al., 2000; Ma et al., 2001; Giglio et al., 2006; Silva et al., 2008; Torres et al., 2010c). A locomoção envolve integração das capacidades sensorial e motora, portanto, a perda de uma dessas, ou de ambas, resulta em déficits neurológicos mensuráveis. Para uma avaliação completa, portanto, devem-se incluir testes de avaliação funcional motora e sensitiva (Muir e Webb, 2000).

Um teste comportamental adequado deve ser de fácil aplicabilidade, objetivo, dispensar treinamento prévio dos animais, ou seja, testes que mimetizem atividades cotidianas desses



animais, não causar estresse, utilizar equipamentos simples que forneçam uma avaliação realista de diferentes graus de lesão medular, e oferecer alta confiabilidade entre diferentes avaliadores (Von Euler et al., 1996; Farooque, 2000; Muir e Webb, 2000; Ma et al., 2001). Contudo, é difícil encontrar um único teste que satisfaça todos esses requisitos, especialmente quando se tratam de animais de laboratório como os ratos. Assim, a utilização de múltiplos testes faz-se necessário para atender as necessidades de uma avaliação completa e meticulosa (Von Euler et al., 1996; Farooque, 2000).

### 3.5.1 Escala de BBB

A escala de BBB, assim designada por ter sido desenvolvida por Basso, Beatie e Bresnahan, é baseada na observação da deambulação espontânea em campo aberto. Foi originalmente delineada para avaliar a recuperação locomotora de ratos submetidos a trauma contusivo / compressivo de intensidades variadas (Basso et al., 1995; Basso et al., 1996). É, provavelmente, a mais empregada para avaliar o efeito de diferentes terapias em ratos com TMA (Ohta et al., 2004; Mitsui et al., 2005; Caldeira, 2011).

O treinamento prévio dos animais no período pré-operatório não é obrigatório, contudo, a manipulação cuidadosa com exposição destes ao campo aberto é recomendada. Após realização do TMA, os ratos são avaliados no dia seguinte ao trauma e, geralmente, a cada três dias, durante quatro minutos (Ankeny et al., 2004).

A avaliação baseia-se na análise de movimentos individuais dos membros pélvicos e a relação destes com os membros torácicos, 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 membros pélvicos (Basso et al., 1995).

Nas fases precoce e intermediária da recuperação deambulatória, os escores da escala de 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 pontuados 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 isquiática, 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 membros torácicos e pélvicos. 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 membros pélvicos. 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 membro pélvico, extensão deste e/ou elevação dos membros pélvicos (Basso et al., 1995).

A passada normalmente envolve o suporte de peso com o posicionamento plantar da pata, acompanhado pelo deslocamento cranial e pelo reposicionamento plantar. De acordo com a frequência observada da passada plantar, classifica-se como ausente, ocasional (<50% do tempo), frequente (51-94% do tempo) e consistente (95-100% do tempo). A coordenação entre membros torácicos e pélvicos é caracterizada de forma que para cada passo do membro torácico ocorre alternadamente um

passo do membro pélvico, sendo necessário observar três ou quatro passadas sequenciais. Os atributos da coordenação entre membros torácicos e pélvicos são a ausência e as incidências ocasional, frequente e consistente (Basso et al., 1995).

Na fase tardia de recuperação observam-se 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 TMA contusivo / compressivo, os ratos tendem a arrastar os dedos sobre a superfície. Segundo a frequência desta alteração, classifica-se a elevação dos dedos como ausente, ocasional (<50% do tempo), frequente (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 TMA contusivo / compressivo (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. Normalmente, os ratos elevam a cauda durante a locomoção e após TMA, 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, e utilização de câmera de vídeo para a comparação dos resultados nos diferentes grupos experimentais (Basso et al., 1996; Mitsui et al., 2005; Caldeira, 2011).

### 3.5.2 Método de escala descritiva adaptada

Modificações com melhorias foram propostas posteriormente a publicação da escala de BBB, dentre estas, o desenvolvimento de subescores (Von Euler et al., 1997; Metz et al., 2000) em que cada atributo comportamental foi classificado de forma independente, sendo a seguir, adicionado em conjunto a um escore simples (Silva et al., 2008, Torres et al., 2010c). A escala do desempenho motor foi desenvolvido por Von Euler et al. (1996), que, posteriormente, foi adaptada por Silva et al. (2008), sendo utilizado em ratos submetidos à TMA contusivo / compressivo. Com as modificações, foram avaliadas a capacidade motora, posicionamento proprioceptivo, posicionamento tátil, permanência no plano inclinado e a sensibilidade dolorosa (Torres et al., 2010c).

O teste de capacidade motora (CM) é baseado na observação da deambulação espontânea em campo aberto e do caminhar em barras estreitas, suspensas do solo (Von Euler et al., 1996; Von Euler et al., 1997; Farooque, 2000; Silva et al., 2008; Torres et al., 2010c). Este teste avalia a integridade das vias descendentes motoras contidas na substância branca dos funículos laterais, como é o caso dos tratos rubroespinal e corticoespinal, responsáveis pelos movimentos voluntários ou atividade muscular flexora, e dos funículos ventrais, como é o caso dos tratos reticuloespinal e vestibuloespinal, responsáveis pelo movimento involuntário ou atividade muscular extensora (tratos de postura). Presumivelmente, quando os tratos rubroespinal, corticoespinal, vestibuloespinal e reticuloespinal estão envolvidos no trauma, os membros são paralisados e incapazes de produzir movimentos voluntários ou suportar o peso (King, 1999).

Ma et al. (2001) ressaltaram que, apesar da observação cuidadosa da locomoção em campo aberto fornecer informações importantes sobre a existência de alterações, algumas vezes, as anormalidades visibilizadas podem ser sutis e subjetivas e a aplicação de outros testes neurológicos ajudam a percebê-las. Verificou-se então que, o teste de locomoção quando realizado sobre barras estreitas, suspensas do solo, possibilitava a detecção de déficits mínimos que poderiam passar despercebidos no andar em

campo aberto (Farooque, 2000; Metz et al., 2000). Neste teste o comprometimento dos tratos sensitivos dos funículos dorsais, que geram informações para movimentos refinados dos membros e dígitos, pode ser detectado com maior sensibilidade. É possível, portanto, avaliar a eficácia de diferentes estratégias terapêuticas sobre as alterações proporcionadas pelo trauma, pois, além de sua alta sensibilidade, mesmo para pequenas lesões, e por ter uma escala gradual objetiva, apresentam resultados altamente correlacionados com as alterações histológicas (Von Euler et al., 1996; Von Euler et al., 1997; Farooque, 2000; Metz et al., 2000).

Os testes de posicionamentos proprioceptivo (PP) e tátil (PT) avaliam o sistema sensorial, o qual determina a capacidade do animal na identificação do posicionamento do membro quando flexionado, estendido, ou anormalmente posicionado, e o sistema motor, ou seja, a resposta de retorno do membro à posição normal (King, 1999). Uma resposta diminuída ou ausente sugere lesão no trajeto sensorial ou motor. O fascículo grácil, que está localizado nos funículos dorsais, carrega propriocepção consciente ou censo de posição dos membros pélvicos para o córtex cerebral e capacita o animal a corrigir os membros quando posicionados de forma anormal em relação ao corpo. Já os tratos corticoespinhais são os responsáveis pela resposta motora de reposicionamento do membro (King, 1999).

Os tratos espinocerebelares dorsal e ventral transmitem informações proprioceptivas dos membros pélvicos para o cerebelo, a fim de fornecer impulsos aferentes necessários para coordenar o movimento muscular, e estão localizados na região mais superficial dos funículos laterais da medula espinhal. Esses tratos são afetados precocemente em compressões superficiais da medula espinhal e produzem ataxia (King, 1999). Por isso, a propriocepção é afetada logo no início das doenças neurológicas e é a última a recuperar a normalidade (Silva et al., 2008; Torres et al., 2010c).

O teste do plano inclinado (PI) desenvolvido por Rivlin e Tator (1977), é amplamente utilizado para avaliação do trauma medular em ratos. Esse teste permite detectar discretas alterações que não podem ser visibilizadas facilmente no caminhar, que muitas vezes parece normal em animais com lesões medulares de pouca intensidade.

A avaliação da sensibilidade dolorosa (SD) é o teste prognóstico mais importante do exame neurológico e constitui um indicador confiável da integridade da medula. A dor é transmitida por vários tratos espinhais, entre eles o espinotalâmico, espinocervical e espinoreticular. Os tratos espinotalâmicos carregam estímulos de dor profunda e temperatura captados pelos membros (King, 1999). Para que a modalidade de dor profunda seja destruída deve haver um acometimento grave e bilateral da medula espinhal e, por isso, nesses casos, o prognóstico torna-se desfavorável (King, 1999; Farooque, 2000).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi desenvolvido nos Departamentos de Clínica e Cirurgia Veterinárias e de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). Realizou-se este estudo de acordo com os princípios adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, que emitiu o protocolo de número 46/2012.

##### 4.1 Isolamento e cultivo de CTM da medula óssea

As CTM da medula óssea foram obtidas segundo Azizi et al. (1998) e Caldeira (2011), sendo utilizados três ratos machos Lewis transgênicos para produção da proteína fluorescente verde (GFP)<sup>1</sup>. Imediatamente após a eutanásia dos animais com sobredose de tiopental sódico<sup>2</sup>, os fêmures e tíbias foram dissecados sob técnica asséptica. Após remoção das epífises ósseas, o canal medular foi irrigado com DMEM<sup>3</sup>,

<sup>1</sup> LEW-Tg eGFP F455/Rrc, Rat Resource and Research Center, University of Missouri, USA.

<sup>2</sup> Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Dulbecco's Modified Eagle Medium. Gibco, Grand Island, NY, USA.

suplementado com 10% de soro fetal bovino<sup>4</sup> e antibióticos / antimicótico<sup>5</sup> (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 250 ng/mL de anfotericina). O conteúdo proveniente da medula óssea foi centrifugado por 10 minutos a 1400 g. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* contendo células foi ressuspenso e cultivado no mesmo meio em garrafas T75<sup>6</sup> cm<sup>2</sup>, mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo das garrafas foi trocado após 24 horas da colheita para remoção das células não aderidas e a cada três dias. Assim que as CTM apresentaram confluência de 80 a 90%, estas foram ressuspenso com tripsina<sup>7</sup>, sendo este procedimento realizado por oito vezes.

#### 4.2 Caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo

Na oitava passagem, as CTM foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placa de 96 poços<sup>8</sup> (fundo redondo) com concentração de 1x10<sup>6</sup> 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 1400 g e 10 °C, sendo removido o sobrenadante em seguida. Em cada poço, foram adicionados 50 µL do anticorpo primário (1:30) diluído em PBS 0,15 M (NaCl 136,9 mM; KCl 2,7 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9,6 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM), incluindo anti-CD45<sup>9</sup>, anti-CD54<sup>10</sup> e anti-CD90<sup>11</sup>. A placa foi incubada por 30 minutos a 4 °C, sendo em seguida, centrifugada por 10 minutos a 1400 g e 10 °C. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados em cada poço 150 µL de PBS 0,15 M para lavagem das células. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 1400 g e 10 °C. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados em cada poço 50 µL do anticorpo secundário<sup>12</sup> diluído 1:25 em PBS 0,15 M. A placa foi envolta em papel de alumínio e mantida por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, foi

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

Posteriormente a retirada do sobrenadante, as células foram ressuspenso em 100 µL de PBS 0,15 M e 100 µL de formaldeído a 4%, para leitura e análise no citômetro de fluxo FACScan<sup>13</sup>. Foi utilizado o software *Cell Quest*<sup>14</sup>, com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros *Forward scatter* e *Side scatter* em escala linear e fluorescência relativa em escala logarítmica. Foi detectada luz de comprimento de onda de 530 nm, correspondente a fluorescência verde, para análises pelo programa WinMDI apresentados em gráficos de histogramas (Tropel et al., 2004; Ishii et al., 2005).

#### 4.3 Preparação das CTM para o transplante celular

Imediatamente antes da inoculação removeu-se o meio de cultivo presente nas garrafas T75 cm<sup>2</sup> contendo CTM e realizou-se lavagem destas por três vezes com 10 mL de PBS. Após a remoção desta solução, as CTM foram ressuspenso com 2 mL de tripsina, que permaneceu na garrafa por cinco minutos. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos / antimicótico, sendo este meio removido e centrifugado por 10 minutos a 1400 g. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* contendo as células foi ressuspenso com 2 mL de DMEM e homogeneizado. Deste meio, obtiveram-se 2 µL que foram misturados a 49 µL de PBS 0,1 M e 49 µL de azul de tripan (diluído 2:3 em PBS 0,1 M). Depois de homogeneizados, foram colocados 10 µL desta mistura na câmara de Neubauer e as CTM viáveis e inviáveis contadas, determinado-se o volume a ser acrescentado às

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

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

6 TPP culture flask 75cm<sup>2</sup> (cat 90076), TPP (Techno Plastic Products), Trasadingen, Switzerland.

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

8 Tissue culture test plate 96well/round. Sarstedt. Newton, NC, USA.

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

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

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

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

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

14 The Cell Quest™ Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA.

CTM, para uma concentração final de  $0,5 \times 10^4$  de células/ $\mu\text{L}$ .

#### 4.4 Animais

Foram utilizados 60 machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, oriundos do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, com 20 semanas de idade. Os animais foram desverminados com tiabendazol<sup>15</sup> (100 mg/kg) por via oral e mantidos no Centro de Experimentação de Pequenos Animais da EV/UFMG por quatro meses, até que atingissem peso médio de 450 g. Durante todo o período experimental, ficaram acondicionados em caixas plásticas, com quatro animais em cada, mantidas em ambiente com temperatura controlada e com ciclos de claro-escuro de 12 horas, e receberam ração comercial para roedores<sup>16</sup> e água *ad libitum*.

#### 4.5 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com 12 animais cada. A medula espinhal de seis animais de cada grupo foi utilizada para avaliações estruturais e de imunoistoquímica, e as dos demais, para realização da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) em tempo real, para avaliação da expressão dos genes de proteínas pró-apoptóticas, antiapoptóticas e de fatores neurotróficos.

Portanto, uma hora após a cirurgia de laminectomia, seguida ou não de TMA, os animais foram tratados com 10 mg/kg de dantrolene<sup>17</sup> ou volume equivalente de seu placebo (água estéril para injeção<sup>18</sup>), pela via intraperitoneal. Sete dias após a cirurgia, os animais foram tratados com CTM ou volume equivalente de seu placebo (PBS), aplicados pela veia lateral da cauda (Tabela 2).

**Tabela 2 - Grupos experimentais**

Identificação	N	Laminectomia	TMA	1 hora após	7 dias após
CTM	12	Sim	Sim	Placebo	CTM
CTM + DAN	12	Sim	Sim	DAN	CTM
DAN	12	Sim	Sim	DAN	Placebo
CP	12	Sim	Sim	Placebo	Placebo
CN	12	Sim	Não	Placebo	Placebo

CTM = células-tronco mesenquimais; DAN = dantrolene; CP = controle positivo; CN = controle negativo; N = número de animais por grupo; TMA = trauma medular agudo.

#### 4.6 Protocolos anestésico e cirúrgico

Os animais foram preparados para cirurgia asséptica e receberam antibiótico profilático com cefalotina sódica<sup>19</sup> na dose de 30 mg/kg, por via intravenosa, 30 minutos antes do início do procedimento. Realizou-se medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol<sup>20</sup> na dose

de 2 mg/kg, por via intramuscular e indução e manutenção anestésica com isoflurano<sup>21</sup>, administrado por meio de máscara em sistema semiaberto, conforme Torres et al. (2010c) (Figura 1-A).

Cada animal foi depilado na região dorsal entre a segunda vértebra torácica e a terceira lombar (T2

15 Thiaben® - Uci-Farma. São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

16 Nuvilab CR-1, Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil.

17 Dantrolen IV®. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brasil.

18 Água estéril para injeção. ABL - Antibióticos do Brasil Ltda. Cosmópolis, SP, Brasil.

19 Cefalotina Sódica. ABL - Antibióticos do Brasil Ltda. Cosmópolis, SP, Brasil.

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

21 Isoforine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

a L3), e fixado com auxílio de fita adesiva em decúbito esternal na mesa cirúrgica, aquecida por meio de bolsa térmica (Figuras 1-A). Foi realizada antissepsia com iodopovidona degermante<sup>22</sup> e solução de álcool iodado na região previamente depilada. Pele e tecido subcutâneo foram incisados na linha média dorsal, estendendo-se desde a sexta vértebra torácica até a primeira lombar (T6 a L1). As inserções dos músculos epaxiais foram incisadas, e estes afastados lateralmente (Figura 1-B). Com o auxílio de uma pinça de Kocher, realizou-se osteotomia do processo espinhal da 12<sup>a</sup> vértebra torácica (T12). Em seguida, retirou-se a lâmina dorsal de T12 (laminectomia) (Figura 1-C) empregando-se perfuratriz pneumática<sup>23</sup>, com irrigação constante das brocas com solução fisiológica<sup>24</sup> para evitar o aquecimento do tecido ósseo. Após a visualização da medula espinhal recoberta pela dura-máter intacta realizou-se trauma contusivo / compressivo, exceto no grupo CN. Para isso, empregou-se o aparelho estereotáxico desenvolvido na EV-UFGM (Torres et al., 2010c), por meio de contusão com peso de 70 g que permaneceu por cinco minutos comprimindo a medula espinhal exposta (Figura 1-D). Após este período, o aparelho foi removido e a medula traumatizada foi inspecionada. A seguir, irrigou-se o campo cirúrgico com solução fisiológica, realizaram-se aproximação dos músculos seccionados e redução de espaço morto, com sutura padrão simples contínua com fio polipropileno<sup>25</sup> 4-0, e procedeu-se a dermorráfia com pontos simples separados, utilizando-se o fio mononylon<sup>26</sup> 4-0.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixa aquecida a 37 °C, durante aproximadamente cinco minutos, tempo médio da recuperação anestésica e, a seguir, devolvidos a suas caixas originais. Eles receberam cloridrato de tramadol na dose de 2 mg/kg, por via subcutânea, a cada oito horas por três dias consecutivos. Também foi realizada massagem abdominal, três vezes ao dia, para auxiliar a micção e defecação. Os pontos de pele foram removidos sete dias após a cirurgia.

---

22 Biotrat® - LMFarma. São José dos Campos, SP, Brasil.  
23 ECCOS®, Aesculap Laboratórios B. Braun S.A, São Gonçalo, RJ, Brasil.  
24 Cloreto de sódio a 0,9% - Solução eletrolítica injetável - Laboratório Sanobiol Ltda. Pouso Alegre, MG, Brasil.

#### 4.7 Inoculação das CTM ou de PBS

Uma semana após a intervenção cirúrgica, os ratos foram submetidos a novo procedimento anestésico, adotando-se o mesmo protocolo descrito no item 3.6. A inoculação das CTM ou do PBS foi realizada por meio de cateter intravenoso periférico<sup>27</sup>, na veia lateral da cauda. Para facilitar a venopunção, a cauda do animal era mergulhada em água aquecida para promover vasodilatação. Nos ratos do grupo CN, CP e DAN foram administrados 200 µL de PBS e nos dos grupos CTM e CTM+DAN, 200 µL de PBS contendo  $1 \times 10^6$  de CTM, em uma concentração final de  $0,5 \times 10^4$  de células/µL.

#### 4.8 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados para avaliar a função neurológica dos animais, e basearam-se na escala de BBB (Basso, Beattie e Bresnahan) (Basso et al., 1996) (Tabela 3) e no método de escala descritiva adaptada (Silva et al., 2008; Torres et al., 2010c) (Tabela 4).

Inicialmente, com o intuito de facilitar a avaliação neurológica pós-traumática, os animais foram ambientados ao campo aberto e ao manejo dos experimentadores. Essa habituação foi realizada quatro dias antes do início das cirurgias e constou da colocação dos ratos, dois a dois, em uma área de 1 m<sup>2</sup>, durante quatro minutos. Em seguida, os animais foram posicionados sobre as barras de madeira para que deambulassem sobre elas. 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 adaptação, os ratos foram posicionados na plataforma do plano inclinado, por 10 segundos, em cada ângulo de observação. Todas as avaliações foram realizadas 24 horas antes do procedimento cirúrgico e, no período pós-operatório, foram realizadas em 24 horas e a cada três dias até o 28<sup>o</sup> dia (0, 1°, 4°, 7°, 10°, 13°, 16°, 19°, 22°, 25°, 28°). No teste comportamental pela escala de BBB, os animais foram filmados no campo

25 Polipropileno Monofilamentado Azul. Shalon Sutures®. Goiânia, GO, Brasil.

26 Nylon Monofilamentado com agulha. Laboratório B Braund S.A. São Gonçalo, RJ, Brasil.

27 BD Cateter Insyte™. Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda. Juiz de Fora, MG, Brasil.

aberto durante quatro minutos e, ao final do período experimental, dois avaliadores assistiram aos filmes sem conhecer o tratamento ao qual o animal havia sido submetido.

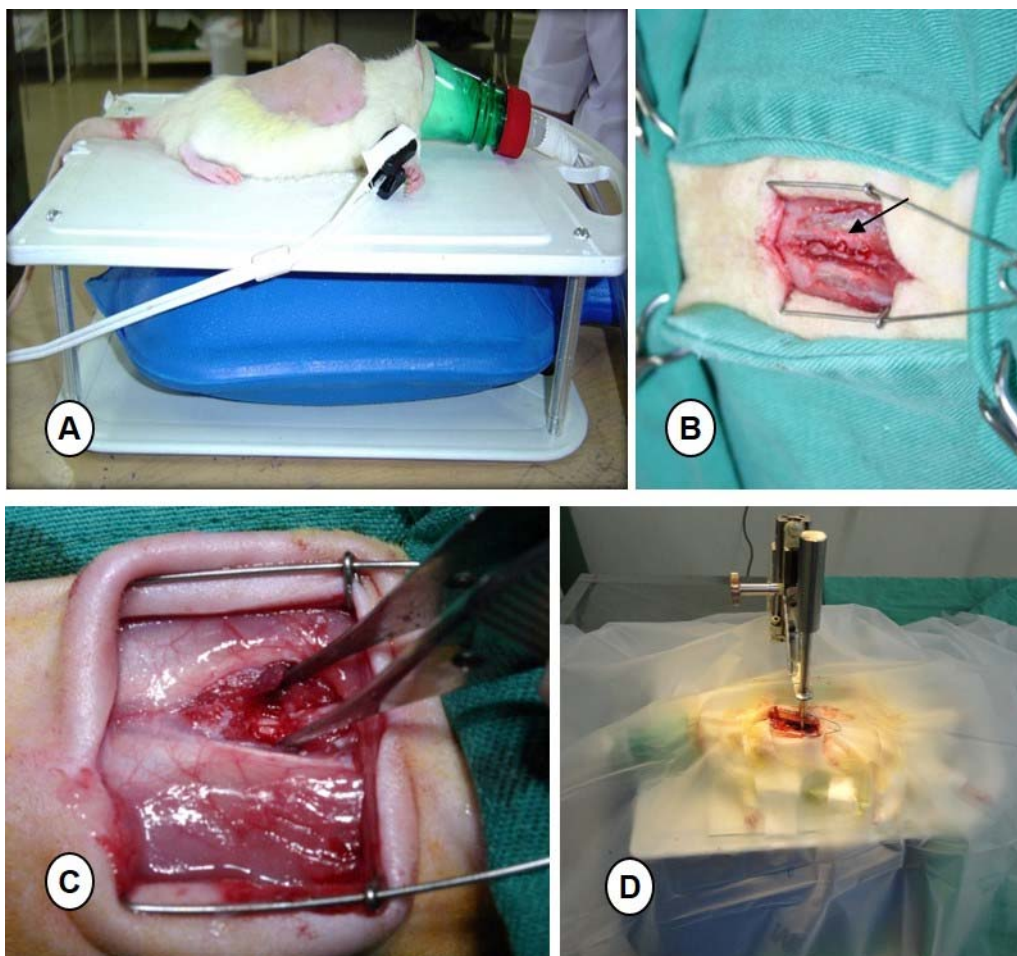
O teste comportamental pelo método de escala descritiva adaptada (Silva et al., 2008; Torres et al., 2010c) consistiu na observação da capacidade motora (CM) e dos posicionamentos proprioceptivo (PP) e tátil (PT), bem como da permanência em estação no plano inclinado (PI), e da avaliação da sensibilidade dolorosa (SD). Os escores dos testes comportamentais estão apresentados na tabela 4. Nos testes de SD, PP e PT os dois membros pélvicos de cada animal foram testados separadamente, e considerou-se para as demais avaliações apenas o membro com pior desempenho na primeira avaliação.

A CM foi avaliada durante a filmagem e baseou-se na observação da atividade espontânea do animal no campo aberto. Neste momento, também foi avaliado o PP das patas, sendo consideradas como critérios a ausência, diminuição e normalidade do reposicionamento quando a pata do membro pélvico ficava com a face plantar em contato com a superfície no campo aberto. Posteriormente, os animais foram colocados sobre as barras de madeira, com espessuras progressivamente mais estreitas. As barras foram apoiadas em cavaletes a 60 cm de altura e tinham um metro de extensão, com larguras variando entre 7,7 a 1,7 cm, com diferença de 1 cm entre elas. Foi considerada,

para registro de escore, a menor barra em que o animal conseguiu locomover-se apoiando os quatro membros. O teste do PT foi realizado com o animal suspenso pelo tronco, mantendo-se os membros pélvicos livres e, em seguida, as superfícies dorsais e laterais das patas foram estimuladas encostando-as na borda de uma mesa. Como resposta, foi observado o reposicionamento da pata, sendo a resposta classificada como ausência, diminuída ou normal.

A avaliação do animal no PI consistiu em colocá-lo em duas posições verticais opostas sobre uma plataforma emborrachada com 28x30 cm. 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 cinco segundos nas duas posições.

A SD foi testada por meio do pinçamento da prega interdigital medial dos membros pélvicos, com auxílio de pinça hemostática mosquito. Foram consideradas como percepção da dor pelo animal as manifestações comportamentais conscientes como a tentativa de retirada do membro estimulado, juntamente com a tentativa de morder e / ou a vocalização do animal.



**Figura 1 - Fotografias do procedimento cirúrgico de trauma medular experimental em ratos Wistar. A) Animal posicionado em decúbito esternal sobre mesa cirúrgica aquecida. Anestesia por meio de máscara em sistema semiaberto; B) Campo cirúrgico, afastamento de musculatura epaxial para identificação dos processos espinhosos; C) Visualização da medula espinhal após laminectomia dorsal; D) Aparelho estereotáxico contusivo/compressivo.**



**Tabela 3 - Protocolo da escala de BBB (Basso, Beatie e Bresnahan) para avaliação do desempenho locomotor, com os respectivos escores (Basso et al., 1996)**

ESCORE	DEFINIÇÃO
0	Nenhum movimento observável dos membros
1	Movimento discreto de uma ou duas articulações, geralmente coxo-femoral e/ou do joelho
2	Movimento extenso de uma articulação OU Movimento extenso de uma articulação e discreto de outra
3	Movimento extenso de duas articulações
4	Movimento discreto das três articulações
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira
7	Movimento extenso das três articulações
8	Pedalada sem suporte de peso OU Apoio plantar sem suporte de peso
9	Apoio plantar com suporte de peso na fase de apoio OU Passada dorsal com suporte de peso ocasional, frequente ou consistente OU Ausência de passada plantar
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e ausência de coordenação entre membros torácicos e pélvicos.
11	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e ausência de coordenação.
12	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e coordenação ocasional.
13	Passo plantar com suporte de peso frequente a consistente e coordenação frequente
14	Passo plantar com suporte de peso e coordenação consistentes. Com rotação externa ou interna da pata no contato inicial com piso e antes de liberar os dedos (final da fase de apoio) OU Passo plantar frequente, coordenação consistente e passos dorsais ocasionais
15	Passo plantar e coordenação consistentes e dedos encostam constantemente ou frequentemente no piso durante a elevação do membro. A pata está predominantemente paralela ao corpo no contato inicial
16	Passo plantar e coordenação consistentes e os dedos encostam ocasionalmente durante o avanço do passo. A pata está predominantemente paralela no contato inicial e rotacionada quando se eleva durante o avançar do passo
17	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos encostam ocasionalmente no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança
18	Passo plantar e coordenação consistentes, os dedos praticamente não encostam mais na superfície. A pata está paralela no contato inicial e rotacionada no momento de elevação da pata
19	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está baixa parte ou todo tempo
20	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima, porém há instabilidade do tronco
21	Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima e há estabilidade do tronco

**Tabela 4 - Protocolo do método de escala descritiva adaptada para avaliação dos testes comportamentais com os respectivos escores, conforme Silva et al. (2008)**

ESCORE	TESTES COMPORTAMENTAIS
<b>SENSIBILIDADE DOLOROSA (SD)</b>	
0	Ausente
1	Diminuída
2	Normal
<b>CAPACIDADE MOTORA (CM)</b>	
0	Nenhum movimento nos membros pélvicos, sem apoio de peso.
1	Movimento sutil, desconexo dos membros pélvicos, sem apoio de peso.
2	Movimento bem visível nos membros pélvicos, sem apoio de peso.
3	Apoio de peso nos membros pélvicos, anda com déficit acentuado.
4	Anda com déficit moderado
5	Anda com déficit discreto e não consegue andar na barra de 7,7 cm
6	Anda normal ou com déficit discreto e consegue andar na barra de 7,7 cm
7	Consegue andar na barra de 6,7 cm
8	Consegue andar na barra de 5,7 cm
9	Consegue andar na barra de 4,7 cm
10	Consegue andar na barra de 3,7 cm
11	Consegue andar na barra de 2,7 cm
12	Consegue andar na barra de 1,7 cm
<b>POSICIONAMENTO PROPRIOCEPTIVO (PP)</b>	
0	Ausente
1	Diminuído
2	Normal
<b>POSICIONAMENTO TÁTIL (PT)</b>	
0	Ausente
1	Diminuído
2	Normal
<b>PLANO INCLINADO (PI)</b>	
1	Permanece em um ângulo 30° menor do que antes da cirurgia
2	Permanece em um ângulo 20° menor do que antes da cirurgia
3	Permanece em um ângulo 10° menor do que antes da cirurgia
4	Permanece no mesmo ângulo que antes da cirurgia

#### **4.9 Avaliação anatomopatológica da medula espinhal e demais órgãos sistêmicos**

No 30° dia após a cirurgia, os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg), por via intraperitoneal. Seis animais de cada grupo tiveram suas medulas espinhais colhidas para processamento histopatológico e, os demais seis, para avaliação de RT-PCR em tempo real.

Para processamento histopatológico, os animais foram submetidos à cardiopunção e perfusão intracardíaca com 200 mL de tampão fosfato (PBS) (0,1 M; pH 7,4) seguida de 200 mL de paraformaldeído<sup>28</sup> tamponado a 4% com PBS. A seguir, foram necropsiados e coletaram-se fragmentos de fígado, rim, baço, músculo esquelético longíssimo lombar, diafragma, pulmão e coração, os quais foram fixados em formol a 10% tamponado. Posteriormente, foram

28 Paraformaldeído Granulado PA. Synth. Diadema, SP, Brasil.

processados de acordo com técnicas rotineiras para inclusão em parafina histológica, e cortados em micrótomo, com 5 µm de espessura.

As medulas espinhais foram dissecadas e fixadas em paraformaldeído a 4% tamponado, pernoite a 4 °C. Os segmentos medulares entre T8 e L3, com aproximadamente 2,8 cm, foram coletados e divididos em secções: cranial ao epicentro, epicentro, e caudal ao epicentro da lesão. Estes também foram processados de acordo com técnicas rotineiras para inclusão em parafina histológica e cortes feitos com 4 µm de espessura, provenientes do epicentro, e 4 mm cranial e 4 mm caudal a este. Os cortes de medula e diversos órgãos foram corados por hematoxilina-eosina<sup>29</sup> (H.E.) (Luna, 1968) para avaliação pela microscopia óptica e realização de análise morfológica descritiva.

#### 4.10 Avaliação imunoistoquímica da medula espinhal

Cortes histológicos provenientes dos segmentos medulares 4 mm cranial e 4 mm caudal ao epicentro foram submetidos à imunoistoquímica para avaliação de corpos neuronais, utilizando-se anticorpos monoclonais (anti-NeuN)<sup>30</sup>. Secções foram montadas em lâminas gelatinizadas<sup>31</sup> e, posteriormente, foram desparafinadas e desidratadas, segundo protocolo padrão. Foi realizada recuperação antigênica por meio de aquecimento das lâminas por 40 minutos em solução de ácido cítrico<sup>32</sup> a 0,05% (20 minutos em banho-maria e 20 minutos em repouso na mesma solução); bloqueio das peroxidases endógenas em solução de metanol<sup>33</sup> e peróxido de hidrogênio (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>34</sup>, por 30 minutos, em câmara escura; bloqueio de epítomos inespecíficos com *protein block*<sup>35</sup>, por 30 minutos também em câmara úmida e escura. Em seguida, as secções histológicas foram incubadas pernoite, na câmara úmida e escura, com o anticorpo primário monoclonal (NeuN 1:1000).

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

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

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

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

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

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

Após este período, o anticorpo secundário<sup>36</sup> foi adicionado, e os cortes incubados da mesma forma por 45 minutos. Em seguida, foi acrescentado o complexo estreptoavidina biotina peroxidase<sup>37</sup> e novamente incubado por mais 30 minutos. As reações foram reveladas com 3-3' diaminobenzina peroxidase (DAB)<sup>38</sup> por 25 segundos, lavadas em água corrente por 10 minutos, e contracoradas com hematoxilina. Após estas etapas, procederam-se a desidratação padrão e montagem das lâminas com lamínulas e bálsamo do Canadá.

A contagem de corpos neuronais marcados pelo anticorpo monoclonal anti-NeuN foi realizada em microscópio óptico, em objetiva de imersão (100 x), e foi contado o número de corpos neuronais marcados por campo. Utilizaram-se para quantificação, dez campos (número mínimo comum para todos os animais) da região de substância cinzenta de cada um dos segmentos analisados. Os resultados foram expressos como número médio de corpos neuronais NeuN-positivos por campo em cada grupo, conforme Torres et al., 2010a.

#### 4.11 RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores neurotróficos BDNF e NT-3, e dos fatores associados a apoptose Bcl-xl, Bcl-2, Bax, caspase-3 e caspase-9

No 30º dia após a cirurgia, os demais animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg), por via intraperitoneal. Os animais de cada grupo foram necropsiados e, imediatamente, foram colhidos dois segmentos de 5 mm da medula espinhal, correspondentes as porções cranial e caudal ao epicentro da laminectomia e / ou do trauma, os quais foram imediatamente congelados a -80 °C, para posterior processamento. Em relação aos genes de interesse, foram escolhidos os *primers* das proteínas antiapoptóticas Bcl-xl<sup>39</sup> e Bcl-2<sup>40</sup>,

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

36 LSABTM, Link for AP/HRP (cat k0690), Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA.

37 LSABTM, Streptavidin/HRP (cat k0690), Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA

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

39. Anti-Bcl-xl. Sigma - Aldrich, MO, USA.

40 Anti-Bcl-2, AnaSpec New Corporate Headquarters. Fremont, CA, USA.

das pró-apoptóticas Bax<sup>41</sup>, Caspase-3<sup>42</sup> e Caspase-9<sup>43</sup> e de fatores neurotróficos NT-3<sup>44</sup> e BDNF<sup>45</sup> e da proteína constitutiva beta-actina<sup>46</sup>,

utilizada como normalizador, de acordo com as especificações necessárias para a realização da RT-PCR em tempo real (Tabela 5).

**Tabela 5 - Genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real**

Gene	Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')
Beta-actina	<i>forward</i> : 5' GCGTCCACCCGCGAGTACAA 3' <i>reverse</i> : 5' ACATGCCGGAGCCGTTGTCTG 3'
Bcl-xl	<i>forward</i> : 5' CCCAGAAAGAAACTGAACCA 3' <i>reverse</i> : 5' AGTTTACCCCATCCCGAAAG 3'
Bcl-2	<i>forward</i> : 5' - CACCC CTGGC ATCTT CTCCTT -3' <i>reverse</i> : 5' - AGCGT CTTCA GAGAC AGCCAG -3'
Bax	<i>forward</i> : 5' CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC 3' <i>reverse</i> : 5' AGTTGCCATCAGCAAACATGTCA 3'
Caspase-3	<i>forward</i> : 5'-CAAACCTTTTTTCAGAGGGGATCG-3' <i>reverse</i> : 5'-GCATACTGTTTCAGCATGGCAC-3'
Caspase-9	<i>forward</i> : 5' TGGAGGAGGCTGACCCGGCAA 3' <i>reverse</i> : 5' CCACAGCTCCGCGACTTGCA 3'
Neurotrofina-3	<i>forward</i> : 5' TGTGACAGTGAGAGCCTGTGG 3' <i>reverse</i> : 5' TGTAACCTGGTGTCCCCGAA 3'
BDNF	<i>forward</i> : 5' CACAATGTTCCACCAGGTG 3' <i>reverse</i> : 5' TGGGCGCAGCCTTCAT 3'

#### 4.1.1.1 Isolamento do RNA

A extração do RNA foi realizada adicionando-se 1 mL do reagente Trizol<sup>47</sup> em cada segmento de medula espinhal, que foi mantida resfriada até o degelo, sendo então realizada a maceração da amostra, com auxílio de pistilo de polipropileno estéril<sup>48</sup>, livre de RNases e DNases. O período de incubação com este reagente foi de 5 minutos e a seguir foram adicionados 200 µL de clorofórmio (por mL de Trizol), com vigorosa agitação por 15 segundos e outra incubação por mais 3 minutos, sob resfriamento. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C, para formação das três fases. A fase aquosa (transparente) foi então transferida para novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico para precipitação do RNA. As amostras foram congeladas a -80 °C por 30 minutos e após este período foram descongeladas e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA

foi hidratado com 1 mL de etanol a 75% (por mL de Trizol). As amostras foram centrifugadas a 7.500 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por cuidadosa inversão dos tubos que ficaram secando em temperatura ambiente com as respectivas tampas abertas, por aproximadamente 5 minutos. A seguir, para solubilizar o RNA, adicionaram-se 20 µL de água ultrapura DEPC<sup>49</sup>, sendo as amostras mantidas por 10 minutos a 55 °C. Posteriormente, em outro tubo adicionaram-se 98 µL de água ultrapura DEPC e 2 µL do RNA diluído (1:50), que 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 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260 / 280 nm.

41 Anti-Bax, AnaSpec New Corporate Headquarters, Fremont, CA, USA.

42 Anti-Caspase-3. Assay Designs, Inc. Ann Arbor, MI, USA.

43 Anti-Caspase-9. Assay Designs, Inc. Ann Arbor, MI, USA.

44 Anti-NT-3. Sigma - Aldrich, MO, USA.

45 Anti-BDNF. Sigma - Aldrich, MO, USA.

46 Anti-β-actina. Sigma - Aldrich, MO, USA.

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

48 Pellet pestle. Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA.

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

#### 4.11.2 Síntese do cDNA

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

#### 4.11.3 Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real

Para realização da RT-PCR em tempo real, preparou-se para cada amostra uma mistura contendo 12,5 µL de SYBR Green e 1 µL de Rox (diluído 1:10), presentes no kit (cat.11735032), bem como 7 µL de água ultrapura, 1 µL do *primer forward* e 1 µL do *reverse* dos genes estudados (concentração de 5 pmol/µL da solução estoque a 100 pmol/µL). Posteriormente, foram também adicionados a esta mistura 2,5 µL do cDNA, perfazendo-se um volume final de 25 µL. Em todas as reações, foi incluído controle negativo, em que se substituiu o cDNA por igual volume de água ultrapura. A seguir, realizou-se a RT-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 °C 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 dos genes das proteínas antiapoptóticas Bcl-x1 e Bcl-2, das pró-apoptóticas Bax, Caspase-3 e Caspase-9 e de fatores neurotróficos NT-3 e BDNF 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 dos tratamentos. 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*. Inicialmente, o delta *Ct* do grupo CP foi comparado ao delta *Ct* médio do grupo CN, formando o delta delta *Ct* que foi submetido ao método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para análise relativa dos resultados da transcrição (Livak e Schmittgen, 2001), para estudar o comportamento da expressão dos fatores apoptóticos e neurotróficos entre animais saudáveis e submetidos ao TMA. Posteriormente, os valores de delta *Ct* dos demais grupos foram comparados ao delta *Ct* médio do grupo CP, formando o delta delta *Ct* que, da mesma forma, foi submetido ao método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para análise relativa dos resultados da transcrição, para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a expressão dos fatores apoptóticos e neurotróficos de animais submetidos ao TMA.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Os resultados dos testes comportamentais foram submetidos à análise de variância pelo teste de *two-way* ANOVA e o número de corpos neuronais pelo teste de *one-way* ANOVA, e a significância entre as médias estabelecida pelos testes de Bonferroni e Student-Newman-Keuls (SNK), respectivamente. A análise dos resultados da transcrição, obtidos pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , entre os grupos CP e CN foi avaliada pelo teste t, enquanto dentre os demais grupos, foi utilizado ANOVA e, a significância entre as médias, estabelecida pelo SNK. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico *GraphPad Prism 5 for*

---

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

Windows, adotando como nível de significância 5%.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo

As CTM da medula óssea 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 (Figura 2), característica morfológica também observada por Friedenstein et al. (1976), Tropel et al. (2004), Dominici et al. (2006) e Caldeira (2011).

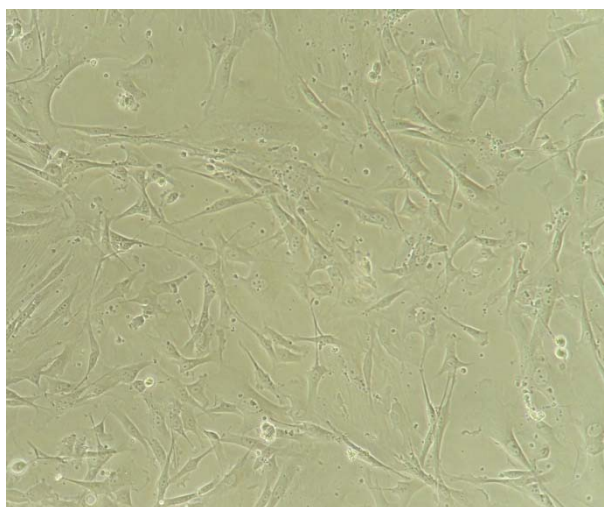


Figura 2 - Fotomicroscopia de células-tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea de ratos, cultivada em garrafa T75 cm<sup>2</sup> contendo DMEM e 10% de soro fetal bovino, vista em microscópio invertido (100 µm).

Com o cultivo, as CTM foram purificadas, devido à seletiva aderência que apresentam à superfície plástica da garrafa. 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* (Dominici et al., 2006). Como observado na figura 3, apenas 2,45% das CTM apresentaram-se marcadas para o antígeno CD45, e em relação aos anticorpos CD54 e CD90, houve imunomarcação de 82,27%

e 87,89%, respectivamente. A caracterização fenotípica das CTM da medula óssea é necessária, uma vez que não estão presentes marcadores celulares específicos, além de estarem presentes fibroblastos (Ishii et al., 2005) e CT hematopoiéticas (Thuret et al., 2006). Nas moléculas apresentadas por estes dois últimos tipos celulares ocorre a expressão de CD45 (Pittenger et al., 1999; Tropel et al., 2004; Ishii et al., 2005), enquanto que as expressões de CD54 e CD90 ocorrem nas CTM (Dominici et al., 2006), resultado obtido no presente estudo.

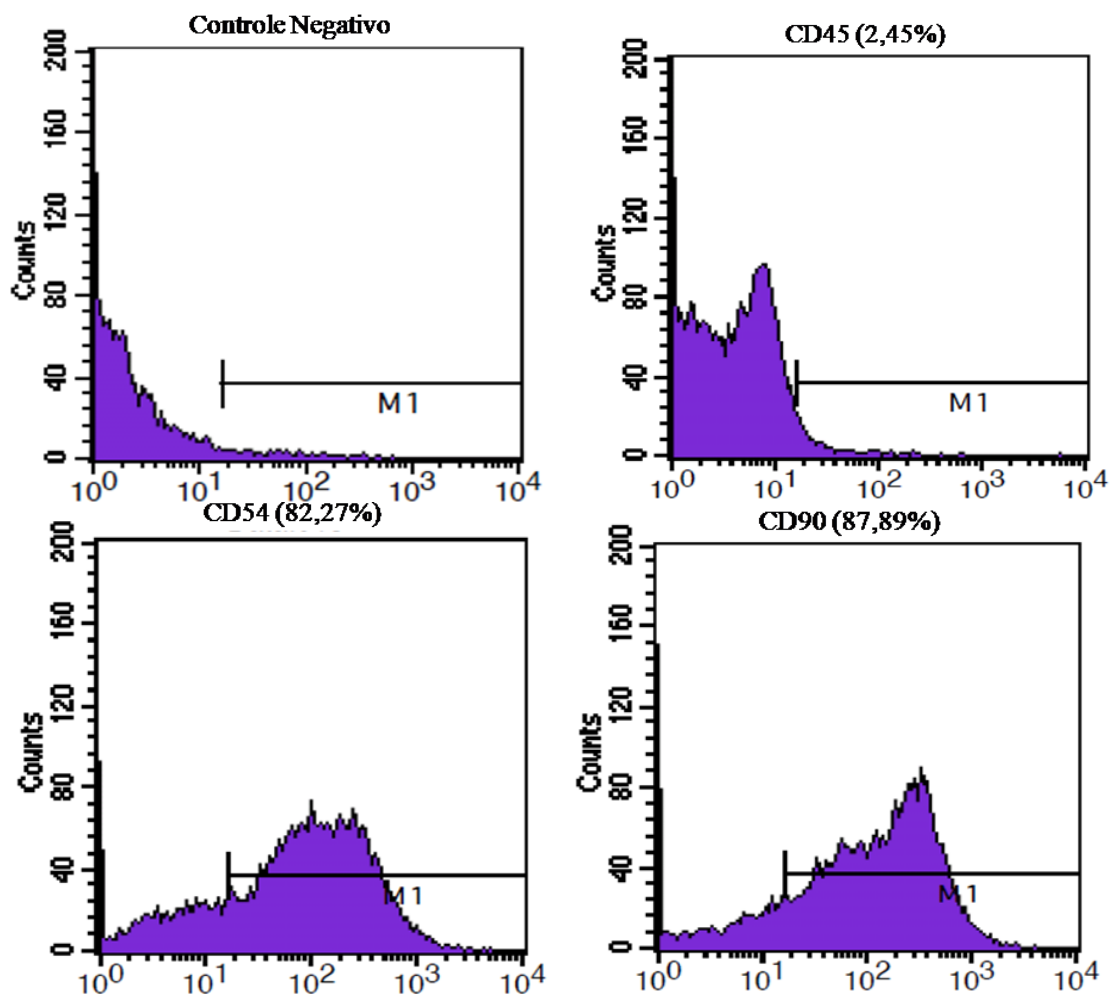


Figura 3 - Histogramas da citometria de fluxo com o padrão de expressão das moléculas de superfície presentes em CTM indiferenciadas da medula óssea de ratos após oitava passagem. Estas células apresentaram imunomarcagem de 2,45% para o antígeno CD45, 82,27% para o CD54 e 87,89% para o CD90. (M1: corresponde à imunomarcagem positiva das células acima de  $10^1$ ).

## 6.2 Procedimentos cirúrgicos

O modelo de trauma contusivo / compressivo por peso possibilitou a avaliação do tratamento proposto e acompanhamento da evolução do processo clínico-patológico instaurado. A utilização do aparelho estereotáxico desenvolvido na EV-UFGM (Torres et al., 2010c), permitiu reproduzir TMA em ratos de maneira padronizada e satisfatória.

Os animais apresentaram tolerância satisfatória à intensidade dos procedimentos, confirmando, portanto, modelo experimental viável e adequado

para o estudo dos efeitos das CTM e do dantrolene no tratamento do TMA. Taoka e Okajima (1998) e Ma et al. (2001) relataram alta taxa de sobrevivência, consequentes do emprego de protocolo anestésico seguro, procedimento cirúrgico asséptico e padronizado, e cuidados pós-operatórios intensivos, apesar da gravidade das lesões instauradas. A viabilidade deste modelo já foi anteriormente observada por Silva et al. (2008), Torres (2008), Torres et al. (2010c) e Caldeira (2011).

A utilização de peso compressivo de 70 g, com superfície de contato de  $1 \text{ mm}^2$ , diretamente

sobre a dura-máter em T12, durante cinco minutos, resultou em paraplegia grave dos membros pélvicos, retenção urinária com hematúria e constipação concomitantes, alterações semelhantes as observadas por Mitsui et al. (2005), Torres (2008), Torres et al. (2010a), Caldeira (2011) e Torres et al. (2011) e compatíveis com lesão medular aguda grave.

Distúrbios comportamentais, como alteração de apetite e infecção ou deiscência de pontos na ferida cirúrgica não foram observados. Não foi observada qualquer alteração na ferida que sugerisse reação ao fio cirúrgico empregado, o que já era esperado, uma vez que foram utilizados fios de sutura monofilamentados a base de polipropileno e mononilón, que são inertes.

Uma hora após a cirurgia de laminectomia seguida ou não de TMA, os animais foram tratados com 10 mg/kg de dantrolene ou volume equivalente de seu placebo (água estéril para injeção), pela via intraperitoneal. A escolha do momento de aplicação do fármaco foi baseada na evidência que o acúmulo de  $Ca^{2+}$  intracelular inicia-se cerca de 30 minutos após a lesão (Chacón e Nieto-Sampedro, 2005). Além disso, seus efeitos neuroprotetores já foram demonstrados quando utilizados nessa dose, uma hora após o TMA (Torres et al., 2010a; Martins et al., 2011; Torres et al., 2011).

Sete dias após a cirurgia, os ratos foram submetidos a novo procedimento anestésico, adotando-se o mesmo protocolo descrito no item 3.6. Nos animais pertencentes aos grupos inoculados com CTM (CTM e CTM+DAN) ou com placebo (CN, CP e DAN), os tratamentos foram administrados por meio de injeção via cateter intravenoso periférico na veia lateral da cauda. A dose de  $1 \times 10^6$  CTM por animal foi utilizada, baseada em diversos estudos anteriores, que demonstraram resultados neuroprotetores, tanto no comportamento funcional quanto em avaliações histológicas e microestruturais, conforme discutido na meta-análise de Oliveri et al. (2014).

A aplicação intravenosa mostrou-se um método de fácil execução, eficaz, rápido e seguro, uma vez que se tratou de procedimento não invasivo, ao contrário das observações dos estudos cujas injeções de CTM foram intralesionais e, para

isso, os animais precisaram ser submetidos à reintervenção cirúrgica (Caldeira, 2011; Kang et al., 2012). Nesse caso, Shin et al. (2013) e Oliveri et al. (2014) citam que, além de novo risco anestésico, a agulha usada para injeção intraliesional pode causar lesões adicionais e, o volume das células injetadas, resultar em aumento de pressão dentro da medula espinhal.

A aplicação pode ser intraliesional, intratecal ou intravenosa (Ohta et al., 2004; Shin et al., 2013; Oliveri et al., 2014). A via intravenosa é, certamente, a menos invasiva, embora o acúmulo de CTM no interior dos órgãos que atuam como filtros naturais, tais como pulmão, fígado e baço, pode ser mais consistente quando injetadas por esta via (Eggenhofer et al., 2012; Shin et al., 2013). A via de administração das CTM pode influenciar o caminho que essas células percorrem até atingir a medula espinhal lesada (Takeuchi et al., 2007; Eggenhofer et al., 2012; Kang et al., 2012; Kim et al., 2013). Além disso, a adesão pulmonar parece ser um fenômeno transitório e, além do que, as CTM podem exercer plasticidade terapêutica, mesmo quando não conseguem migrar completamente para o local da lesão, devido à secreção de fatores parácrinos (Eggenhofer et al., 2012; Oliveri et al., 2014).

Estudos recentes confirmaram a utilização segura da via intravenosa, quanto ao fato de promover o aporte eficaz das CTM ao local desejado e permitir resposta neuroprotetora após TMA (Takeuchi et al., 2007; Osaka et al., 2010; Kang et al., 2012; Kim et al., 2013; Oliveri et al., 2014). O fator-1 derivado do estroma (SDF-1, também conhecido como CXCL12) juntamente com seu receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) foram recentemente identificados como responsáveis pelo processo de quimiotaxia, que induz a migração das células transplantadas ao local da lesão (Tysseling et al., 2011; Jaerve et al., 2012; Zendedel et al., 2012). Além disso, o presente grupo de pesquisa identificou o aporte das CTM GFP ao local da lesão espinhal após sua injeção intravenosa por método de imunistoquímica com anticorpo policlonal anti-GFP.

Osaka et al. (2010) demonstraram que, após administração por via intravenosa, as CTM derivadas de medula óssea de ratos foram capazes de atingir o local desejado, nos períodos



de seis horas a 28 dias após a indução de TMA contusivo / compressivo grave, semelhante ao produzido no presente estudo. Além disso, esses pacientes tratados sistemicamente com CTM apresentaram redução na formação de cavitação, aumento dos níveis de BDNF no local da lesão e melhora no resultado funcional, resultados semelhantes aos do presente trabalho.

No estudo de Kang et al. (2012), a quantidade de CTM observadas na medula espinhal lesionada foi menor após aplicação por via intravenosa do que por via intralésional. Além disso, após aplicação sistêmica, muitas CTM foram observadas no baço. No entanto, os animais que receberam as CTM pela via intravenosa mostraram melhora clínica mais eficaz, em comparação àqueles do grupo controle e dos que receberam as células via intralésional. Isso sugere que os efeitos neuroprotetores inerentes à aplicação de CTM não são meramente relacionados ao número absoluto das células enxertadas.

No estudo de Xu et al. (2012), foram aplicadas  $1 \times 10^6$  CTN diluídas em 1 mL de DMEN pela veia da cauda de ratos Wistar, sete dias após o TMA contusivo / compressivo. Esses autores reportaram as vantagens da injeção intravenosa, por ser um procedimento minimamente invasivo, possuir grande potencial das células para alcançar a área do TMA, e eliminar o risco de hemorragia e / ou lesão intraespinhal, em comparação com a injeção intralésional. Os resultados desse estudo demonstraram melhora funcional e estrutural, observadas pelo aumento significativo dos escores na escala de BBB e diminuição das áreas de cavitação na medula espinhal, respectivamente.

Finalmente, em um estudo recente, Kim et al. (2013) demonstraram que a administração de CTM, tanto por via intravenosa quanto por via intralésional, na fase crônica da lesão, seis semanas após TMA, promoveu recuperação locomotora semelhante nos dois grupos avaliados, apesar das células fornecidas por via sistêmica terem sido observadas em menor número na medula espinhal lesada.

### 6.3 Testes Comportamentais

Os testes comportamentais empregados demonstraram fácil aplicabilidade, objetividade

e não resultaram em estresse para os animais, que se adaptam aos mesmos rapidamente. Além disso, foram realizados com equipamentos simples e de baixo custo. A utilização das escalas de BBB e descritiva adaptada fez-se necessária para atender às necessidades de uma avaliação completa e metódica dos déficits sensoriais e motores (Von Euler et al., 1996; Farooque, 2000; Muir e Webb, 2000; Ma et al., 2001; Caldeira, 2011).

Antes da cirurgia, todos os animais apresentaram parâmetros neurológicos dentro da normalidade. Na escala de BBB apresentaram escore máximo (21) e no método de escala descritiva adaptada foram capazes de caminhar sem nenhum déficit no campo aberto, na barra de 1,7 cm, e no PI mantiveram-se em ângulo aproximado de 90° por no mínimo cinco segundos.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais do grupo CN permaneceram capazes de caminhar sobre a barra de 1,7 cm e não apresentaram nenhum déficit neurológico nos demais testes. Esses resultados estão de acordo com os de Kaptanoglu et al. (2003), Silva et al. (2008), Torres (2008), Torres et al. (2010c), Caldeira (2011) e Martins et al. (2011) que também não observaram déficits nos ratos submetidos somente à laminectomia. Por se tratar de um procedimento delicado e de difícil execução, devido ao tamanho do animal em estudo, qualquer mínima lesão acidental na medula espinhal durante a cirurgia, acarreta em discreto déficit neurológico (Farooque, 2000; Giglio et al., 2006).

Todos os animais dos demais grupos experimentais que foram submetidos ao TMA (CTM, CTM+DAN, DAN e CP) apresentaram déficit neurológico grave na primeira avaliação que ocorreu 24 horas após o procedimento cirúrgico. Na escala de BBB apresentaram escore zero, ou seja, sem nenhum movimento observável nos membros. Já no método de escala descritiva adaptada, no teste de CM observou-se paraplegia dos membros pélvicos e, portanto, incapacidade de apoio do peso sobre os mesmos. Ausência de resposta nos testes de SD, PP e PT também foram observados, e os animais não foram capazes de se manter em angulação superior a 60° no PI. Resultados semelhantes foram descritos por Silva et al. (2008), Torres (2008) e Caldeira (2011), o que consolida a

padronização clínica do modelo de lesão espinhal utilizado, já descrito anteriormente (Torres et al., 2010c).

Posteriormente, os animais foram avaliados a cada três dias até o 28º dia. Nenhum dos animais apresentou recuperação total das funções na escala de BBB ou no método de escala descritiva adaptada após 28 dias de avaliação. Em todos os grupos, exceto o CP, os ratos recuperaram progressivamente diferentes graus de função sensorial e motora ao longo do período de observação, o que foi observado com maior intensidade nos grupos tratados com CTM, dantrolene ou associação de ambos.

Os animais dos grupos CTM e CTM+DAN apresentaram recuperação funcional significativa na escala de BBB em relação aos do CP a partir do 22º e 25º dias de observação, respectivamente (Figura 4). No 22º dia, os animais tratados com CTM apresentavam movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira ( $p < 0,05$ ). No 25º dia, apresentavam movimento extenso das três articulações ( $p < 0,01$ ) e no 28º dia, pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar sem suporte de peso ( $p < 0,001$ ). Já os tratados com associação de CTM e dantrolene, no 25º e no 28º dias, apresentavam movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira ( $p < 0,05$ ).

Já na avaliação dos resultados do método de escala descritiva adaptada, a partir do 4º dia os animais do grupo DAN apresentavam SD significativamente maior que os do grupo CP ( $p < 0,001$ ), e a partir do 13º dia apresentaram recuperação semelhante aos animais normais do grupo CN ( $p > 0,05$ ). Aos 7 dias, os animais do grupo DAN apresentavam maior SD que os animais do grupo CTM ( $p < 0,001$ ) e CTM+DAN ( $p < 0,01$ ). A partir do 7º dia os animais do grupo CTM+DAN apresentavam SD significativamente maior que os do grupo CP ( $p < 0,01$ ), e partir do 16º dia apresentaram recuperação semelhante aos animais normais do grupo CN ( $p > 0,05$ ). No 10º, 13º e a partir do 25º dias, os animais do grupo CTM apresentavam SD significativamente maior que os do grupo CP ( $p < 0,001$ ), e a partir do 25º dia apresentaram SD semelhante à dos animais normais do grupo CN ( $p > 0,05$ ). Os animais do grupo CP não apresentaram recuperação da SD em relação aos animais do grupo CN ( $p < 0,001$ ) (Figura 5) em

nenhum momento durante o período de observação.

No teste de CM, no 13º ( $p < 0,05$ ) e a partir do 19º ( $p < 0,001$ ) dias, os animais do grupo CTM apresentavam apoio de peso nos membros pélvicos com déficit acentuado, resultado significativamente maior que os do grupo CP, cujos animais continuavam sem nenhuma movimentação nem apoio de peso. A partir do 16º dia os animais do grupo CTM+DAN apresentavam movimento bem visível nos membros pélvicos, sem apoio de peso, resultado significativamente maior que os do grupo CP ( $p < 0,05$ ). A partir do 22º dia os animais do grupo DAN apresentavam movimento bem visível nos membros pélvicos, sem apoio de peso, resultado significativamente maior que os do grupo CP ( $p < 0,05$ ). Os animais do grupo CP não apresentaram recuperação da CM em relação aos animais do grupo CN ( $p < 0,001$ ) (Figura 6).

De forma semelhante, nos testes de PP e PT, somente os animais do grupo CTM apresentavam melhora a partir do 22º dia em relação aos do grupo CP ( $p < 0,01$ ). Os animais do grupo CTM+DAN, DAN e CP não apresentaram recuperação de PP e PT em relação aos animais do grupo CN ( $p < 0,001$ ) (Figura 7 e 8).

No teste de PI, a partir do 22º dia, os animais do grupo DAN apresentavam resultado significativamente maior que os do grupo CP ( $p < 0,05$ ). A partir do 25º dias, os animais do grupo CTM apresentavam resultado significativamente maior que os do grupo CP ( $p < 0,05$ ). Os animais dos grupos CTM+DAN e CP não apresentaram melhora no teste de PI em relação aos animais do grupo CN ( $p < 0,001$ ) (Figura 9).

Optou-se pelo trauma grave nos animais estudados, uma vez que a recuperação espontânea e precoce após TMA discreto a moderado tem sido relatada, e pode dificultar a avaliação do tratamento proposto (Jeffery e Blakemore, 1999; Silva et al., 2008; Torres et al., 2010c). Este evento pode ocorrer em função da adaptação ou do retorno funcional dos axônios temporariamente afuncionais que se mantiveram intactos em meio ao tecido danificado (Hollis II e Tuszynski, 2011; McCall et al., 2012).

Existem poucos estudos que demonstram os efeitos do dantrolene sobre a recuperação funcional em TMA. Aslan et al. (2009) observaram melhora funcional significativa na avaliação pelo teste comportamental de Tarlov, em coelhos *New Zeland* tratados com 10 mg/kg de dantrolene em comparação aos animais não tratados, 24 horas após realização de trauma medular, pelo modelo de balão compressivo extradural. Entretanto, questiona-se se a recuperação funcional precoce relatada estaria realmente associada ao efeito neuroprotetor do fármaco, ou se seria recuperação espontânea, devido à um trauma compressivo discreto.

No estudo de Torres (2008), não foi possível observar recuperação neurológica funcional em modelo experimental idêntico ao do presente estudo, cujos ratos foram tratados com 10 mg/kg de dantrolene e avaliados pelo método de escala descritiva adaptada durante oito dias. Os animais tratados com esse fármaco em dose única e observados por oito dias apresentaram maior preservação neuronal (neurônios NeuN-positivos) e menor número de células apoptóticas (caspase-3-positivas), em comparação aos animais que receberam apenas placebo (Torres et al., 2010a). Por isso, aventou-se a necessidade de avaliação por tempo prolongado para observar efeitos clinicamente positivos, devido à gravidade do trauma.

Adicionalmente, diversos estudos demonstram a capacidade de recuperação neurológica funcional de ratos submetidos à TMA, após utilização de CT, via diferentes mecanismos de ação (Oliveri et al., 2004). Embora no estudo de Caldeira (2011) não tenha sido observado diferença na preservação neuronal (neurônios NeuN-positivos) entre os grupos, os animais tratados com CTM apresentaram recuperação funcional significativa na escala de BBB em relação aos animais que receberam placebo.

De forma semelhante aos achados de Shin et al. (2013), no presente estudo, o escore médio do BBB uma semana após o trauma e imediatamente antes da aplicação das CTM era de  $0,4 \pm 0,6$  e, além disso, não havia diferença significativa entre os grupos. Duas semanas após aplicação intravenosa das CTM, os escores do

BBB dos animais tratados com células (CTM e CTM+DAN), mostraram significativa melhora quanto à capacidade motora ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais que receberam somente placebo (Figura 4).

É interessante observar que nas avaliações da capacidade locomotora em campo aberto, tanto pela escala de BBB quanto pela descritiva adaptada, o grupo tratado com CTM apresentou retorno funcional precoce (22º e 13º dias, respectivamente) em relação aos demais grupos (CTM+DAN e DAN), quando comparados ao grupo que recebeu somente placebo (CP). Isso sugere um possível efeito neuroprotetor das CTM sobre as vias motoras corticoespinhais e rubroespinhais. Além disso, somente o grupo tratado com CTM demonstrou melhora da PP e PT, sugerindo possível efeito benéfico das células sobre os tratos sensitivos grácil e espinocerebelares. Em contrapartida, na avaliação de PI, somente o grupo DAN resultou em recuperação funcional, o que sugere ação desse fármaco sobre as vias sensoriais e motoras, avaliadas pelo teste. Finalmente, o grupo DAN apresentou melhores resultados sobre recuperação da SD, demonstrando seus efeitos benéficos sobre os tratos espinotalâmico e espinorreticular.

Portanto, os presentes resultados mostram que os animais submetidos à lesão compressiva com T7 durante cinco minutos, em T12, apresentaram comprometimento grave dos tratos sensitivos e motores responsáveis pela inervação dos membros pélvicos, uma vez que resultou em incapacidade funcional extensa e prolongada dos mesmos. O tempo de observação de 28 dias foi suficiente para demonstrar efeitos neuroprotetores, clínica e estatisticamente significativos das CTM, do dantrolene, ou da associação de ambos, no tratamento de TMA em ratos, nos diversos testes realizados. Em longo prazo, espera-se que a terapia com CT e / ou fármacos neuroprotetores, promova estabelecimento de vias alternativas que contornem os locais afetados (neuroplasticidade) e, possivelmente, a regeneração de axônios lesionados, para aumentar as chances de retorno funcional.

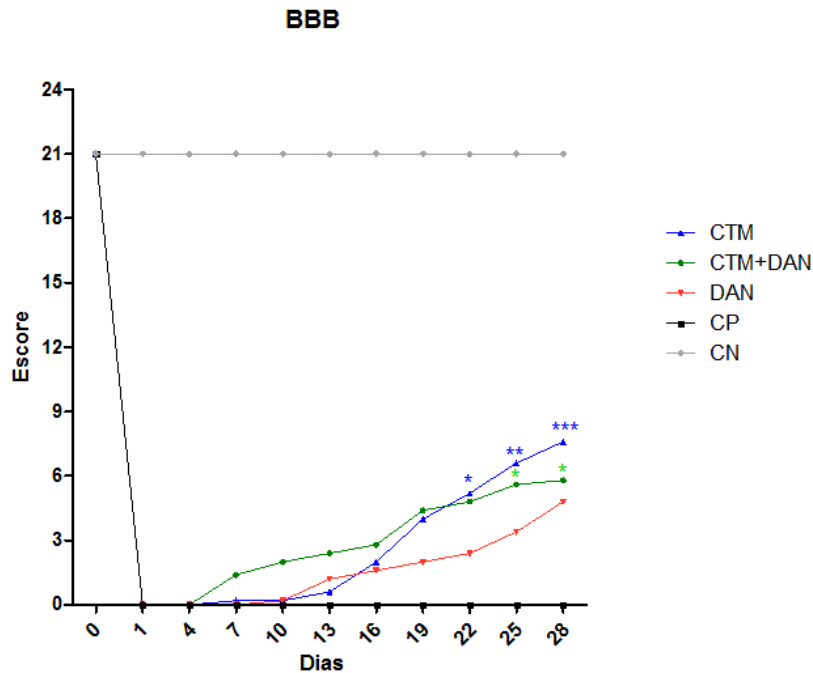


Figura 4 - Gráfico da escala de BBB (Basso, Beattie e Bresnahan), mostrando a evolução dos escores (médias) da avaliação em campo aberto, entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com CTM, células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM ou CTM+DAN apresentaram recuperação funcional significativa em relação aos do CP a partir do 22º e 25º dias de observação, respectivamente (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

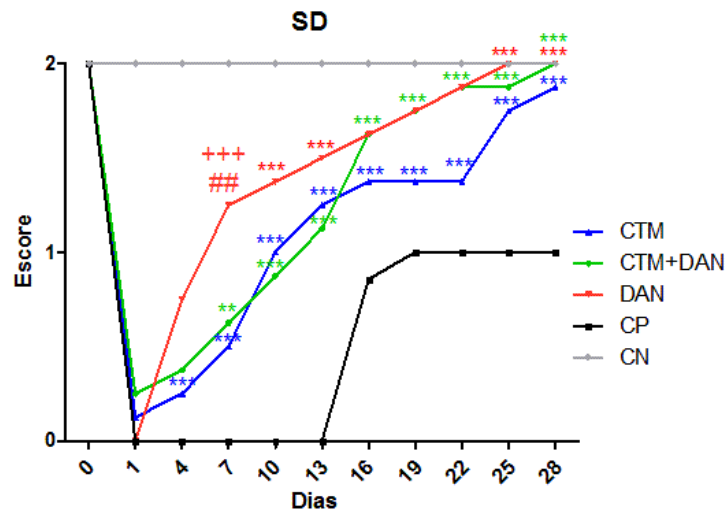


Figura 5 - Gráfico do teste de Sensibilidade Dolorosa (SD), mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM, CTM+DAN ou DAN apresentaram recuperação significativa da SD em relação aos do CP a partir do 4º, 7º e 10º dias de observação, respectivamente (\*\* $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). No 7º dia, os animais tratados com DAN apresentaram maior SD do que os tratados com CTM (+++ $p < 0,001$ ) ou com CTM+DAN (## $p < 0,01$ ).

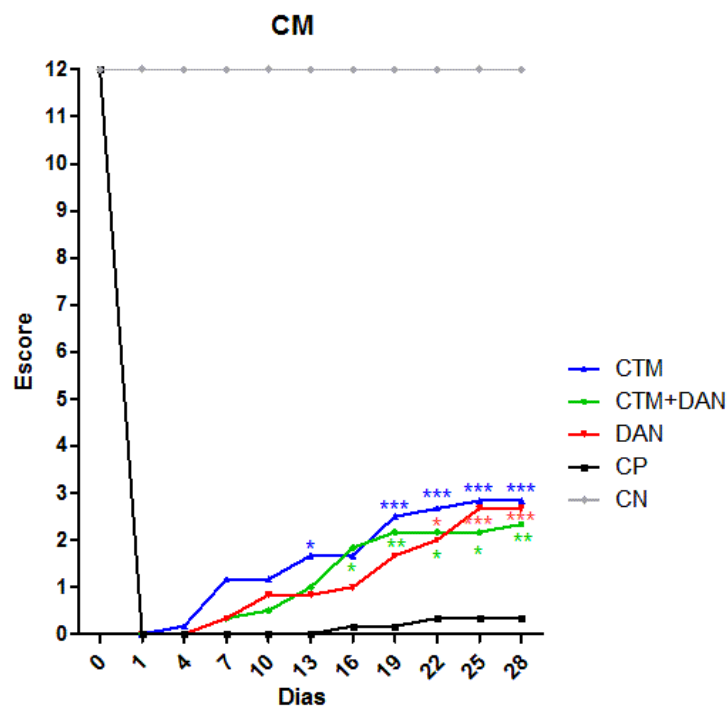


Figura 6 - Gráfico do teste de Capacidade Motora (CM) mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM, CTM+DAN ou DAN apresentaram recuperação significativa da CM em relação aos do CP a partir do 13º, 16º e 22º dias de observação, respectivamente (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

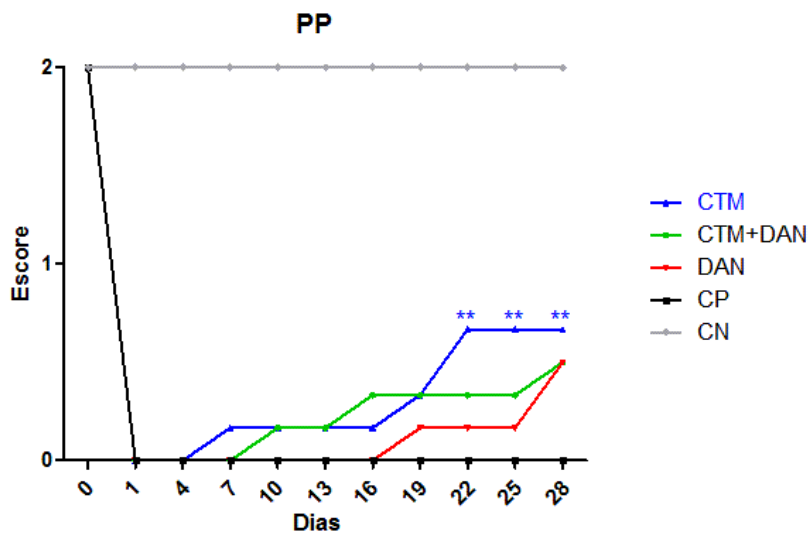


Figura 7 - Gráfico do teste de Posicionamento Proprioceptivo (PP) mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM apresentaram recuperação significativa do PP em relação aos do CP a partir do 22º dia de observação (\*\* $p < 0,01$ ).

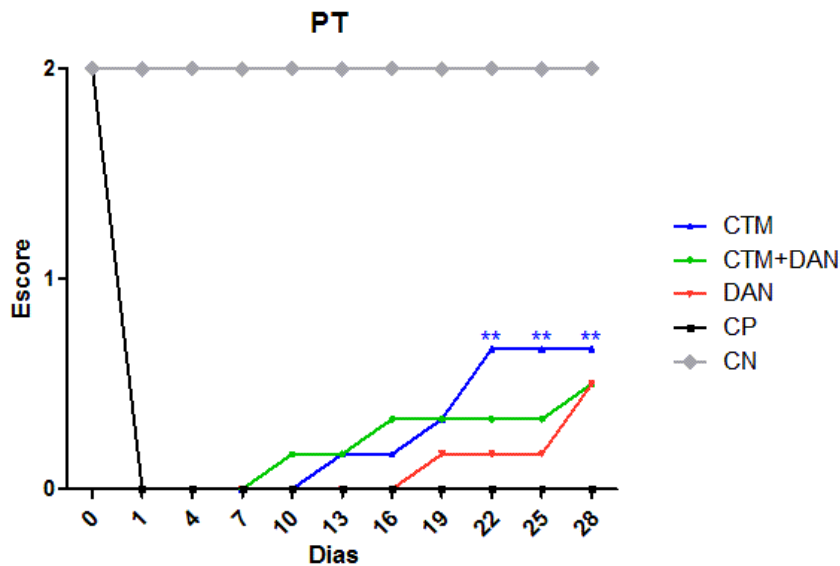


Figura 8 - Gráfico do teste de Posicionamento Tátil (PT) mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com CTM apresentaram recuperação significativa do PP em relação aos do CP a partir do 22º dia de observação (\*\* $p < 0,01$ ).

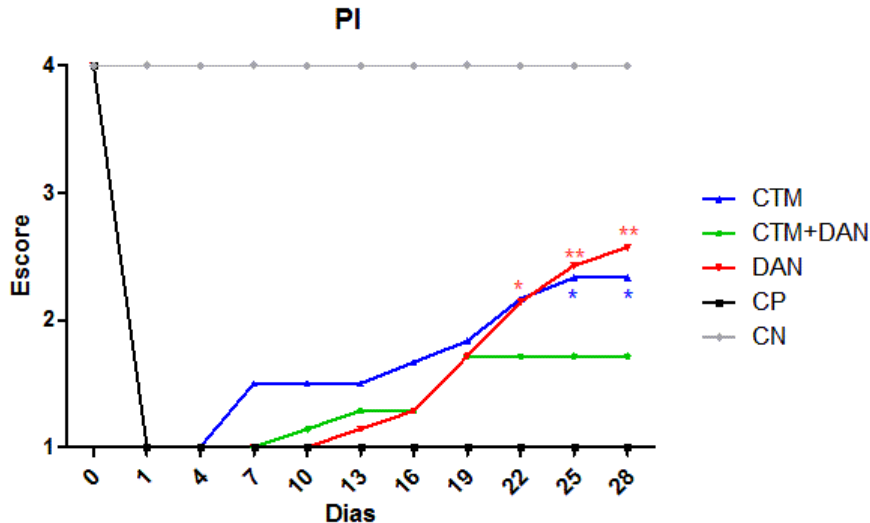


Figura 9 - Gráfico do teste de Plano Inclinado (PI) mostrando a evolução dos escores (média) entre os grupos, durante 28 dias de avaliação de ratos Wistar, submetidos a trauma medular agudo e tratados com células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene (CTM + DAN), dantrolene (DAN) ou placebo (controle positivo - CP). Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos apenas à laminectomia sem trauma medular e foram tratados com placebo. Os animais tratados com DAN ou CTM apresentaram recuperação significativa da capacidade de manterem-se em PI em relação aos do CP a partir do 22º e 25º dias de observação, respectivamente (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

#### **6.4 Avaliação anatomopatológica dos órgãos sistêmicos**

Não foram observadas alterações macro e microscópicas dignas de nota em pulmão, fígado, baço, rins, coração e diafragma dos animais dos cinco grupos, corroborando os estudos de Ward et al. (1986), Torres (2008) e Kim et al. (2011). Entretanto, observou-se à microscopia óptica, degeneração dos feixes fibrosos do músculo longíssimo lombar em todos os animais traumatizados, consistente com hipotrofia muscular por desuso.

Este fato, possivelmente, decorreu-se da interrupção dos impulsos axonais que inervam essa musculatura, além do desuso da mesma, já que os animais com paraplegia de membros pélvicos apresentaram diminuição da carga sobre esse grupo muscular. Essa alteração não foi observada nos animais do grupo que não foi submetido ao TMA (CN). Portanto, a utilização do dantrolene, das CTM ou da associação de ambos (CTM+DAN), não resultou em lesões teciduais nas doses utilizadas, quando comparadas aos grupos tratados somente com placebo que foram (CP) ou não (CN) submetidos ao TMA.

Os efeitos do dantrolene sobre o músculo cardíaco, músculos lisos e glândulas endócrinas foram estudados em ensaios com animais por Bowman et al. (1979), Fournier (1982), Ward et al. (1986) e Harrison (1998) e não foram de importância clínica. Tais achados corroboram ensaios *in vitro* que demonstraram que o dantrolene não tem afinidade pelo receptor rianodina presente nesses órgãos (RYR2) (Krause et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Paul-Platzer et al., 2005). Cães tratados com dantrolene (15 mg/kg por dia) durante 12 meses não apresentaram efeitos deletérios sistêmicos. Contudo, doses mais elevadas (60 mg/kg por dia) causaram redução no ganho de peso, função hepatocelular deficiente, anemia e cristalúria nessa espécie (Fournier, 1982). Hepatotxicidade, debilidade muscular, flebite, e falha respiratória foram os achados mais consistentes com tratamentos crônicos e / ou doses elevadas em humanos (Fournier, 1982; Brandom et al., 2002; Krause et al., 2004; Kim et al., 2011).

O dantrolene apresenta-se, portanto, como um fármaco seguro e com mínimos efeitos colaterais quando utilizado na dose de 10 mg/kg, em dose única para tratamento de ratos com TMA. Resultados semelhantes foram encontrados quando o dantrolene foi utilizado em doses terapêuticas em humanos (Brandom e Larach, 2002; Kim et al., 2011) e animais domésticos (Bowman et al., 1979; Khalaf et al., 1979; Hackler et al., 1980; Harrison, 1998; Edwards et al., 2003; Krause et al., 2004).

Por outro lado, estudos relacionados aos efeitos adversos da utilização de CT, como teratoma, tromboembolismo, migração errática e alodinia, para tratamento de doenças neurodegenerativas em curto ou longo prazo, são escassos. Para evitar as controvérsias do ponto de vista ético e de oncogênese, o transplante de CTM torna-se a opção ideal para terapia clínica celular. Dentre as vantagens da sua utilização, está o fato de poderem ser isoladas a partir da medula óssea e outros tecidos adultos, e facilmente cultivadas e propagadas *in vitro* (Pittenger et al., 1999). Devido à sua pluripotência, as CTM já foram empregadas em injúrias na medula espinhal (Ankeny et al., 2004; Himes et al., 2006; Caldeira, 2011; Kang et al., 2012), encéfalo (Kim et al., 2010) e em nervos periféricos (Chen et al., 2007; Hell et al., 2009).

Apesar da perspectiva potencial do uso das CT na medicina regenerativa, alguns aspectos ainda devem ser considerados e futuramente alvo de investigações, especialmente para caracterizar interação das CT transplantadas ao sistema imunológico do receptor.

A associação de ambos os tratamentos ainda não havia sido avaliada na terapia de TMA. A ausência de lesões teciduais no período de observação neste trabalho fornece subsídios para sua utilização segura na terapia dessa afecção, embora estudos semelhantes com longo prazo de avaliação sejam necessários.

#### **6.5 Avaliação anatomopatológica da medula espinhal**

Macroscopicamente, nos animais dos grupos CTM, CTM+DAN, DAN e CP, observaram-se congestão discreta e aderência moderada de dura-máter e leptomeninges em T12, congestão discreta a moderada na região dorsal da medula,

estendendo-se da região torácica média até a lombar cranial. Os animais do grupo CN não apresentaram alterações macroscópicas na medula espinhal.

À avaliação histológica da medula espinhal dos animais submetidos apenas à laminectomia (CN) não foram constatadas alterações dignas de nota (Figura 10 - A). Essa observação corrobora os escores máximos encontrados nos testes comportamentais, resultados que já foram relatados anteriormente por Torres (2008), Torres et al. (2010c) e Caldeira (2011).

Já nas medulas espinhais dos animais dos grupos CTM, CTM+DAN, DAN e CP foram observados padrões de lesão com características semelhantes entre eles tanto no epicentro da lesão, quanto nas secções cranial e caudal (Figura 10 – B - D). No epicentro da lesão pode-se observar área de malacia expandindo-se dos funículos dorsolaterais da substância branca, bem como dos cornos dorsais e ventrais da substância cinzenta. Nessa região havia discreta proliferação de células da glia e poucas células de Gitter, caracterizando processo de mielomalacia crônica focalmente extensa (Figura 10 – E e F), também observados em estudos anteriores (Beattie, 2004; Caldeira, 2011).

Dependendo da gravidade da lesão, a malacia pode se estender cranial e caudalmente, enquanto nos traumas moderados a medula apresenta cavitações císticas centrais, em alguns casos mais graves toda a medula se torna necrótica e sofre liquefação, sendo sua estrutura mantida apenas pelas meninges (Summers et al., 1995).

Nas áreas adjacentes ao epicentro da lesão, foram observadas, na substância branca, degeneração Walleriana, degeneração balonosa multifocal discreta, sendo raras as câmaras de digestão e cavitações. Também foram observados aumento difuso e acentuado da celularidade na substância cinzenta, neuroniofagia e satelitose discretas. Além disso, as alterações histológicas observadas nas regiões adjacentes ao epicentro incluem características morfológicas de apoptose, as quais, aparentemente, foram mais observadas no grupo CP. Foram visibilizados neurônios e células da glia com crescente condensação citoplasmática e da cromatina e formação de corpos apoptóticos, dentre outras.

A formação de balões axonais, câmaras de digestão e malacia são características comumente descritas durante a evolução das lesões em modelos de TMA (Li et al., 1996; Beattie, 2004). Dentro de uma semana, a maioria dos balões axonais tendem a desaparecer (Von Euler et al., 1997) e, no período de quatro semanas áreas bem demarcadas de cavitações podem surgir nas substâncias branca e / ou cinzenta (Radojicic et al., 2005). Degeneração Walleriana extensa e tecido cicatricial preenchido por astrócitos e outras células da glia e fibroblastos podem estar presentes. Estas alterações representam os estágios finais da evolução histopatológica da lesão medular (Crowe et al., 1997; Radojicic et al., 2005; Shin et al., 2013).

Com base nestas observações, pode-se perceber que o trauma contusivo / compressivo desencadeado por um peso de 70 g durante cinco minutos sobre a medula espinhal, foi eficiente em promover uma lesão de intensidade grave, padronizada entre os grupos que foram submetidos ao TMA. O TMA proporcionou déficits sensorial e motor graves, conforme observações dos testes neurológicos, discutidos anteriormente. Embora aos 30 dias os tratamentos não tenham resultado em recuperação das alterações morfológicas da medula espinhal, observou-se em todos os testes neurológicos que houve recuperação funcional parcial, mais evidente entre os animais tratados com CTM e / ou dantrolene, quando comparados aos animais tratados com placebo (CP).

Pode haver restabelecimento da função perdida após considerável injúria tecidual, mesmo não havendo reversão da lesão, devido à capacidade do SNC em sofrer plasticidade em seus circuitos. Além disso, sinapses inativas podem ser convertidas em funcionais formando novos padrões de circuitos alternativos (Coumans et al., 2001; Sasaki et al., 2009; Caldeira, 2011, Hollis II e Tuszynski, 2011; McCall et al., 2012).

Assim o efeito das CT transplantadas, do dantrolene e da associação de ambos, pode ter promovido melhor neuroplasticidade, seja por meio de preservação da integridade do tecido neural, fornecimento de estímulos tróficos ou inibição da apoptose, limitando, portanto, sua progressão para áreas adjacentes ao epicentro.



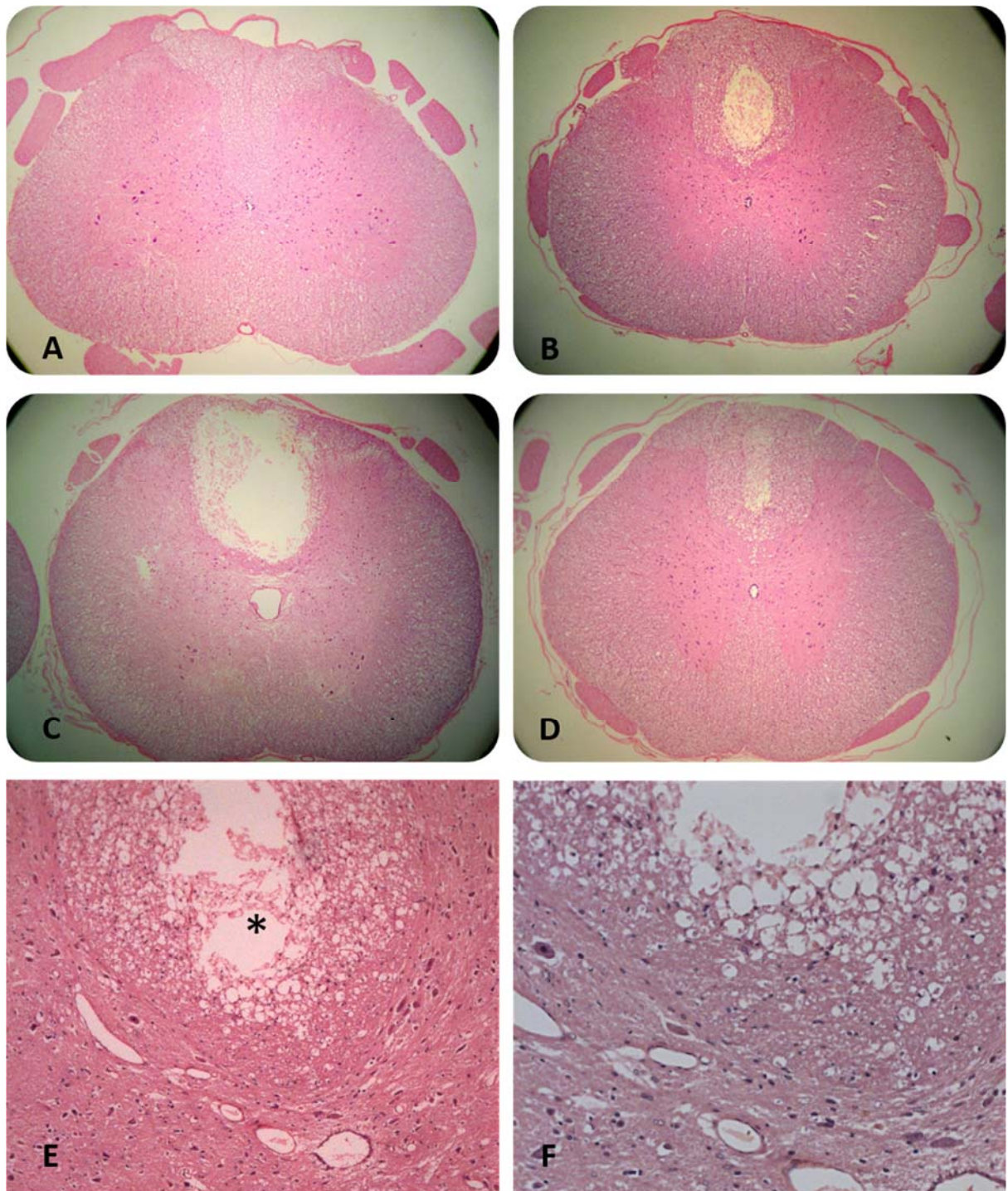


Figura 10 - Fotomicroscopias de seções transversais de medula espinhal de ratos Wistar, coradas em H.E. A) Medula espinhal normal de animal do grupo controle negativo, submetido apenas à laminectomia; B) Secção 4 mm cranial ao epicentro da lesão após trauma medular agudo; C) Epicentro da lesão após trauma medular agudo; D) Secção 4 mm caudal ao epicentro da lesão após trauma medular agudo (40 X). Detalhes mostrando cavidade cística (asterisco) (E, 200 X) e discreta gliose (F, 400 X), caracterizando processo de mielomalacia crônica focalmente extensa.

### **6.6 Avaliação imunoistoquímica da medula espinhal**

Na medula espinhal, 4 mm cranial e 4 mm caudal ao epicentro do TMA, NeuN foi expresso em toda a substância cinzenta, em todos os animais dos diversos grupos. Notavelmente, o anticorpo monoclonal anti-NeuN determinou a marcação específica de neurônios, principalmente nuclear e, em menor quantidade, no citoplasma e dendritos, permitindo avaliar a integridade da medula espinhal nos diferentes grupos em estudo (Figura 11).

Não foi observada marcação de células gliais e os neurônios marcados apresentaram, invariavelmente, características morfológicas preservadas, enquanto neurônios com características patológicas (necrose ou apoptose) não apresentaram imunorreatividade ao anti-NeuN. Alguns neurônios apresentaram características morfológicas aparentemente íntegras, embora não estivessem reativos ao anti-

NeuN, o que sugere que o processo patológico resultante do trauma interferiu com a expressão da proteína NeuN.

A quantidade média do número de corpos neuronais, com marcação positiva para o anticorpo monoclonal anti-NeuN por campo (objetiva de imersão), foi estatisticamente igual entre os animais dos grupos tratados com CTM, dantrolene, associação de ambos, e os animais hígidos que não receberam trauma medular do grupo CN, tanto nos segmentos craniais quanto nos caudais ao epicentro ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6). Além disso, esses quatro grupos apresentaram número médio de neurônios NeuN-positivos significativamente maior quando comparados aos animais do grupo CP, tratados com placebo, cranial e caudalmente ao epicentro da lesão ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 12). Estes resultados sugerem que o tratamento com CTM, dantrolene ou associação de ambos, promoveu maior preservação neuronal, ou seja, menor extensão da lesão, trinta dias após o TMA.

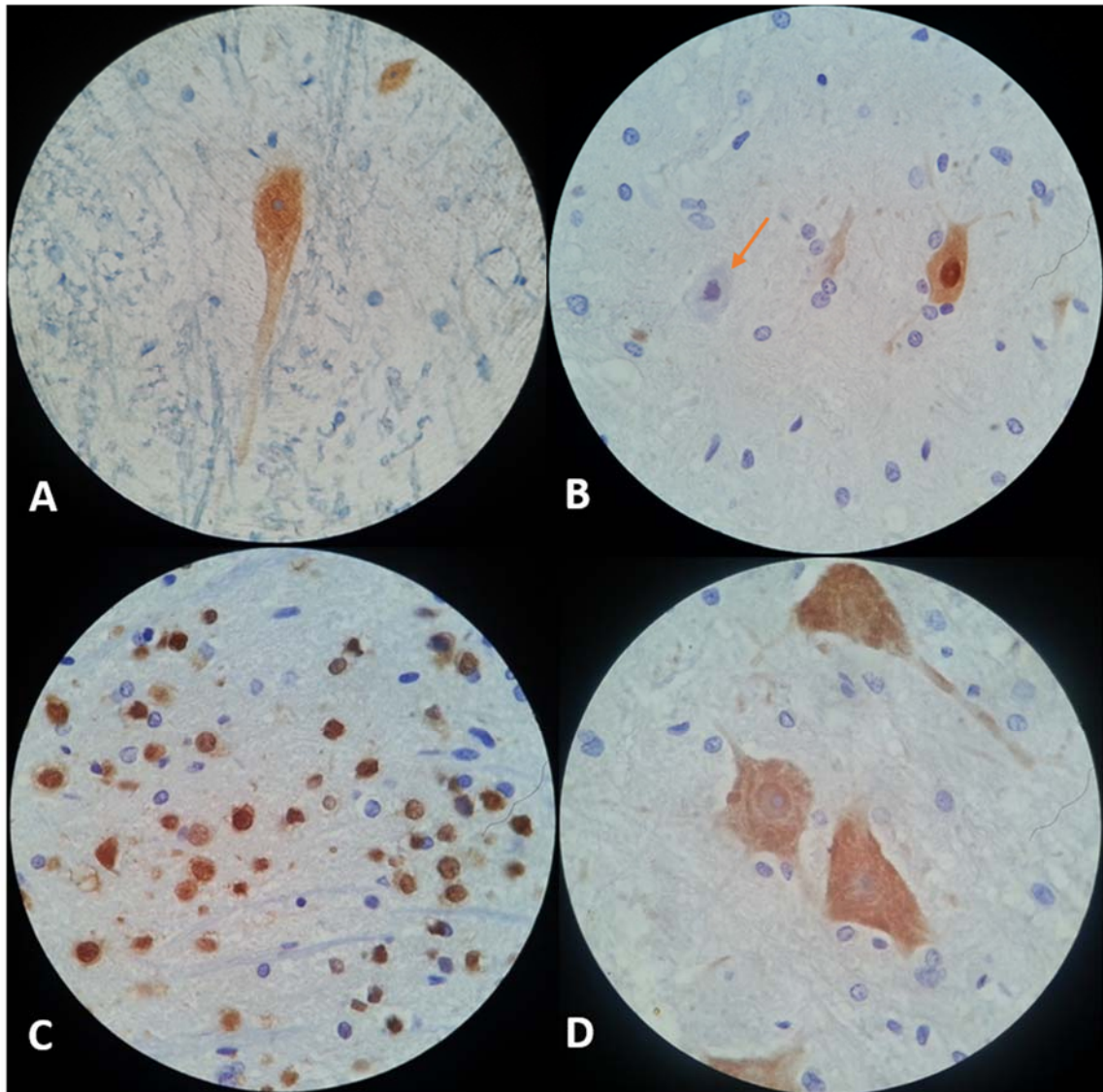


Figura 11 - Fotomicroscopias de secções transversais de medula espinhal 4 mm adjacentes ao epicentro da lesão em ratos Wistar. Imunoistoquímica com anti-NeuN (100 x). A) Detalhe de marcação de núcleos de corpos neuronais íntegros (NeuN-positivos) na substância cinzenta (animal do grupo controle negativo) B) Detalhe de neurônio não marcado pelo anti-NeuN (seta) (animal do grupo controle positivo); C) Detalhe de marcação de neurônios sensoriais NeuN-positivos nos cornos dorsais (animal do grupo células-tronco mesenquimais e dantrolene); D) Detalhe de marcação de neurônios motores NeuN-positivos nos cornos ventrais (animal do grupo dantrolene)

Tabela 6 - Médias e erros-padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos por campo, em segmentos cranial e caudal ao epicentro do TMA, em medula espinhal de ratos Wistar

Tratamento	Cranial	Caudal
CTM	24,3±0,6	25,1±0,4
CTM+DAN	25,6±0,9	26,0±1,4
DAN	27,25±0,6	25,4±1,8
CP	13,1±1,5	14,5±1,3
CN	26,1±1,0	23,8±1,6

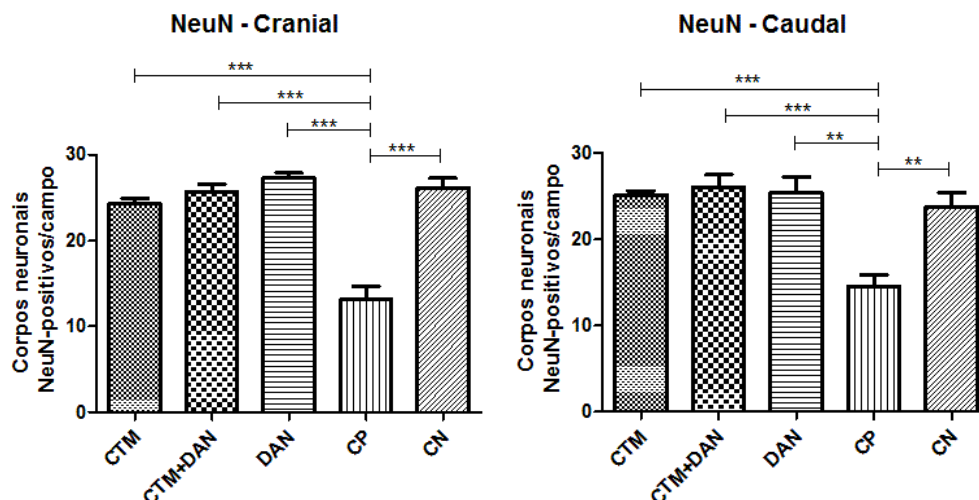


Figura 12 - Gráficos das médias e erros-padrão do número de corpos neuronais NeuN-positivos por campo, em segmentos cranial e caudal ao epicentro do TMA, em medula espinal de ratos Wistar. CTM – células-tronco mesenquimais; CTM + DAN – células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene; DAN – dantrolene; CP - controle positivo; CN - controle negativo. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Mullen et al. (1992) desenvolveram o anticorpo monoclonal A60, ou anti-NeuN, para identificar o antígeno, ou a proteína *Neuronal Nuclei* (NeuN). O antígeno NeuN, identificado como o Fator Fox-3 (Kim et al., 2009; Dent et al., 2010; Dredge e Jensen, 2011), é uma proteína especificamente expressa na maioria dos tipos de neurônios e é, portanto, um marcador fiável da identidade neuronal (Wolf et al., 1996). O anti-NeuN é utilizado como marcador neuronal em diagnósticos histopatológicos, em isolamentos de culturas celulares ou organotípicas e identificação de diferenciação neuronal após cultivo e/ou transplante de CT (Ünal-Çevik et al., 2004; Lavezzi et al., 2013). Sua utilização permite avaliar quantitativa a perda de células neuronais em doenças neurológicas, como epilepsia, acidentes vasculares encefálicos, doenças neurodegenerativas e traumáticas. A alta especificidade para os neurônios e densa marcação, mesmo de pequenos interneurônios, torna essa técnica adequada para a avaliação da densidade neuronal (Wolf et al., 1996).

O NeuN é um constituinte específico de neurônios e está presente no núcleo, no corpo celular e dendritos, sendo precocemente expresso em neurônios a partir da fase inicial de diferenciação celular e molecular (Todd et al., 1998; Xu et al., 2002; Lavezzi et al., 2013). O

NeuN não é expresso em células da glia, ou seja, oligodendrócitos, astrócitos ou células da microglia não expressam essa proteína. Segundo Mullen et al. (1992) e Casella et al. (2004) a expressão de altas concentrações do NeuN pode corresponder ao estado de diferenciação ou atividade neuronal, ou seja, a imunorreatividade ao anti-NeuN diminui sob condições patológicas diversas que afetam a viabilidade neuronal, como isquemia, hipóxia e trauma (Xu et al., 2002).

Ünal-Çevik et al. (2004) demonstraram que a diminuição da expressão do NeuN no encéfalo de camundongos após isquemia cerebral não significou necessariamente perda neuronal. A menor imunorreatividade também pode estar relacionada a distúrbios funcionais, como alterações antigênicas, disfunções sinápticas e quimiorrecepção alterada, mecanismos que são fundamentais para manutenção da vitalidade celular.

Portanto, uma vez que houve maior número de neurônios expressando NeuN, ou seja, maior preservação neuronal nos animais submetidos ao TMA e tratados com CTM, dantrolene ou associação de ambos, em relação aos tratados com placebo (CP), estes resultados sugerem o efeito neuroprotetor destas terapias isoladas, ou

em associação, no tratamento da lesão medular experimental em ratos.

Torres et al. (2010a) demonstraram efeito neuroprotetor do dantrolene, às 32 horas e oito dias após TMA grave em ratos, ao identificar número de neurônios NeuN-positivos significativamente maior nos animais tratados com o fármaco, quando comparados aos animais que receberam placebo. Nesse estudo, o dantrolene apresentou efeito neuroprotetor por atuar na inibição da expressão de caspase-3, reduzindo a apoptose neuronal.

Em contrapartida, Caldeira (2011) não observou diferença entre o número de neurônios NeuN-positivos na medula espinal de ratos após TMA grave, tratados com CTM ou placebo. Entretanto, nesse estudo, diferindo do atual, as CTM foram injetadas por via intralésional e somente 14 dias após o trauma espinal. Caldeira (2011) indagou sobre o momento ideal para aplicação das CTM e sugere utilização de terapias conjugadas, a fim de se obter melhores resultados.

Além desse trabalho, não foi possível identificar na literatura atual respostas do efeito *in vivo* das CTM sobre a expressão de NeuN na medula espinal de ratos após TMA. No presente trabalho, questionaram-se quais os possíveis mecanismos que permitiram o maior número de neurônios expressando a proteína NeuN nos animais tratados com CTM, DAN ou associação de ambos. Além do efeito antiapoptótico do dantrolene, efeitos anti-inflamatório, varredor de RLO e redutor de óxido nítrico, tem sido associados à este fármaco (Büyükokuroglu et al.,

2001; Büyükokuroglu et al., 2002; Ucuncu et al., 2005; Yoneyama et al., 2011). Já no caso das CTM, o maior número de neurônios íntegros pode estar relacionado aos seus efeitos trófico e neuroprotetor sobre o tecido medular lesionado. Tais efeitos podem ter sido estimulados por fatores de crescimento sabidamente carreados pelas CTM.

### 6.7 Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs dos fatores neurotróficos BDNF e NT-3

Primeiramente, foi estudado o comportamento da expressão gênica do BDNF e da NT-3 na medula espinal dos ratos submetidos ao modelo de TMA grave, proposto por Torres et al. (2010c), em relação à medula espinal de animais não traumatizados. A mensuração por RT-PCR em tempo real foi realizada nas secções 4 mm cranial e 4 mm caudal ao epicentro da lesão. Nos animais do grupo CP, observou-se expressão significativamente menor de BDNF ( $p < 0,001$  cranial e  $p < 0,05$  caudal) e da NT-3 ( $p < 0,001$  cranial e  $p < 0,05$  caudal) em relação a expressão desses fatores na medula espinal íntegra dos animais do grupo CN, aos 30 dias de observação (Figura 13).

A baixa expressão endógena de mRNA dos fatores neurotróficos BDNF e NT-3, aos 30 dias após o TMA grave, sugere um mecanismo de ação patológico crônico, e indica um possível alvo para modulação terapêutica

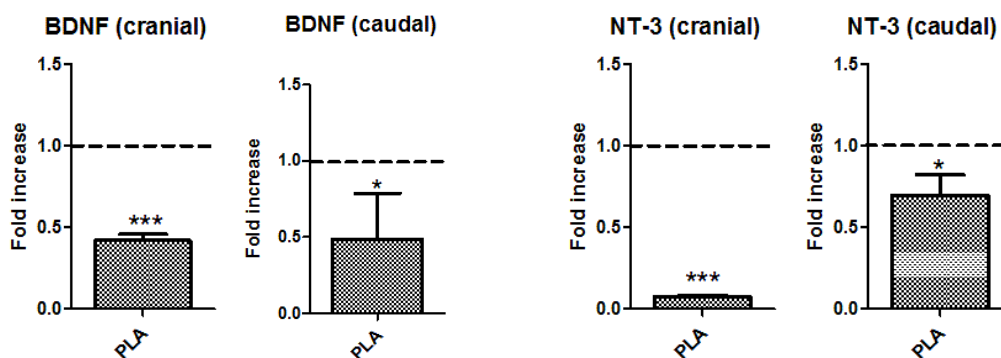


Figura 13 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e da neurotrofina-3 (NT-3). Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo CP em relação ao grupo CN (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CP - controle positivo; CN - controle negativo (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Sabe-se que os níveis dos fatores neurotróficos estão suprarregulados na fase aguda pós-injúria medular (Gerin et al., 2011), seja induzida por excitotoxicidade (Scarlsbrick et al., 1999), por transecção (Qin et al., 2006) ou compressão (Ikeda et al., 2001; Ikeda et al., 2002). A expressão de BDNF e da NT-3 atinge valores máximos três dias após a lesão espinhal (Qin et al., 2006), embora esses níveis pareçam ser insuficientes para superar os mecanismos inibitórios e estimular a regeneração e brotamento compensatório dos axônios lesionados (Schwab, 2002).

Ikeda et al. (2001) utilizaram um modelo de compressão por balão epidural para produzir o TMA, durante 5 minutos, em T8 da medula espinhal de ratos. A expressão do mRNA de BDNF foi examinado usando RT-PCR em tempo real até 4 semanas após TMA. Durante as primeiras seis horas pós TMA, a expressão do BDNF encontrava-se aumentada, valores estes que se duplicaram em 12 horas, e triplicaram em 24 horas, em comparação aos animais do grupo controle, submetidos apenas a laminectomia. Aos três dias após a lesão, os níveis estavam discretamente elevados em relação ao controle, e assim permaneceram pelas próximas duas semanas. Dentro de quatro semanas, a expressão foi inferior aos níveis dos animais não lesionados (Ikeda et al., 2001), o que corrobora os resultados do presente estudo, dessa vez em modelo contusivo/compressivo de TMA.

Uma vez que o BDNF e NT-3 são sintetizados por neurônios e células da glia, e os níveis de suas expressões gênicas e proteicas reguladas pela atividade sináptica neuronal (Bregman et al., 1997; Bregman et al., 1998; Sasaki et al., 2009; Caldeira, 2011; Gerin et al., 2011), a baixa regulação na fase crônica, observada no presente estudo, parece estar associada, principalmente, com destruição dos neurônios, secundária ao TMA.

Dessa forma, a lesão resultante da morte de neurônios e células gliais não pode ser facilmente substituída a partir do *pool* de CTN intrínsecas, e requer provisão de substrato adequado para que os axônios brotem de colaterais e / ou se regenerem e, finalmente, reestabeleçam o circuito interrompido (Bregman et al., 1997; Bregman et al., 1998; Coumans et al., 2001; Ikeda et al., 2002).

O aumento dos níveis de neurotrofinas na medula espinhal lesada pode evitar propagação da lesão secundária e, conseqüentemente, melhora neurológica funcional (Scarlsbrick et al., 1999; Zhou e Shine, 2003; Qin et al., 2006; He et al., 2013). Estudos demonstraram que o transplante de fatores promotores de crescimento resultaram em crescimento axonal e melhora funcional em modelos animais de TMA experimental (Bregman et al., 1997; Bregman et al., 1998; Coumans et al., 2001; Ikeda et al., 2002).

Além disso, tem-se demonstrado o uso de CT modificadas geneticamente para maior produção de fatores neurotróficos para aliviar danos secundários produzidos pelo TMA (Liu et al., 1999; Tobias et al., 2003; Lu et al., 2005; Mitsui et al., 2005; Rooney et al., 2009b; Sasaki et al., 2009; Zhang et al., 2010).

Embora muitos estudos tenham objetivado demonstrar as funções cruciais das neurotrofinas sobre a sobrevivência neuronal e brotamento axonal, poucos avaliaram as mudanças endógenas das neurotrofinas após o TMA (Qin et al., 2006; Caldeira, 2011) frente à tratamentos com potencial ação neuroprotetora.

Por esse motivo, no presente estudo, também avaliaram-se os possíveis efeitos das CTM e do dantrolene, associados ou não, sobre o comportamento endógeno das neurotrofinas BDNF e NT-3 nos animais que sofreram TMA grave, no período crônico, 30 dias pós-trauma.

Nas secções 4 mm cranial e 4 mm caudal ao epicentro da lesão, observou-se aumento significativo da expressão de BDNF nos grupos tratados com CTM, CTM+DAN ou DAN em relação ao grupo CP, aos 30 dias após o TMA ( $p < 0,05$ ). Já a expressão da NT-3, mostrou-se maior somente nos animais que receberam CTM+DAN ou DAN na secção cranial ( $p < 0,05$ ), e DAN na secção caudal ( $p < 0,01$ ) (Figura 14).

Wang et al. (2002) e Wang et al. (2006) demonstraram, respectivamente, em estudos *in vitro* que a liberação de NT-3 e BDNF nos terminações axonais era dependente da despolarização e influxo de  $Ca^{2+}$  para o citoplasma. Com a estimulação das reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$ , maiores concentrações das neurotrofinas foram liberadas, e quando essas reservas foram bloqueadas pelo dantrolene,

a liberação de NT-3 e BDNF foi inibida. Entretanto, sabe-se que após o TMA *in vivo*, mesmo na presença de níveis elevados de neurotrofinas na fase aguda, os demais eventos deletérios impedem o brotamento de colaterais e / ou regeneração axonal. Esses eventos são consequência do excesso de  $Ca^{2+}$  intracitoplasmático, e seu bloqueio tem sido associado com efeitos neuroprotetores por inibição apoptótica (Thorell et al., 2002; Kocogullari et al., 2008; Aslan et al., 2009; Torres et al., 2010a).

Além disso, a utilização das CTM em ratos submetidos a TMA tem demonstrado melhora funcional e diminuição de lesão secundária, tanto no transplante em sua forma indiferenciada, ou quanto geneticamente modificada para maior expressão das neurotrofinas (Tobias et al., 2003; Lu et al., 2005; Mitsui et al., 2005; Sasaki et al., 2009; Rooney et al., 2009b). Independente do mecanismo de ação das CTM indiferenciadas, seja por transdiferenciação, (Woodbury et al., 2000; Safford et al., 2004; Dasari et al., 2007; Wang et al., 2008; Rooney et al., 2009a; Kang et

al., 2012), por preservação e / ou formação de novos circuitos via sinaptogênese (Caldeira, 2011), por carreamento de fatores neurotróficos ou estímulo de sua produção endógena (Ankeny et al., 2004; Ohta et al., 2004; Himes et al., 2006; Osaka et al., 2010), parece consenso geral que a elevação das neurotrofinas apresenta papel relevante sobre tais melhoras dos pacientes traumatizados.

Por fim, embora a diferenciação neural das CTM implantadas não tenha sido objeto do atual estudo, sublinhar uma possível razão para a melhoria funcional sensorial e motora dos animais estudados é fundamental. Além das funções diretas dessas terapias sobre o aumento dos fatores neurotróficos, especula-se que o uso do dantrolene e das CTM tenha proporcionado recuperação funcional, via preservação de células nervosas e, conseqüentemente, de maior função neuronal em longo prazo, que permitisse continuidade ao estímulo da produção e ação das neurotrofinas endógenas.

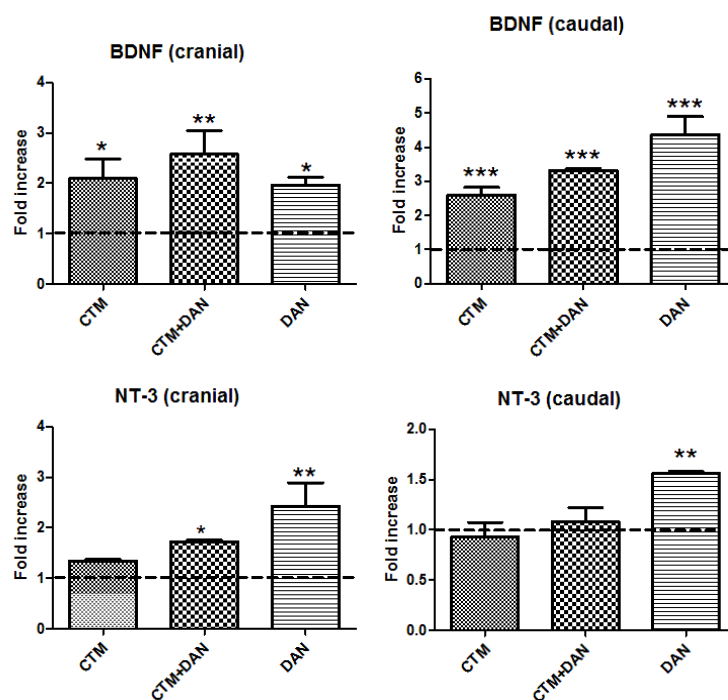


Figura 14 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e da neurotrofina-3 (NT-3). Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, dos grupos CTM, CTM+DAN e DAN em relação ao grupo CP (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CTM – células-tronco mesenquimais; CTM+DAN – células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene; DAN – dantrolene; CP - controle positivo (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### **6.8 Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos mRNAs dos fatores antiapoptóticos (Bcl-2 e Bcl-xl) e pró-apoptóticos (Bax, caspase-3 e caspase-9)**

Primeiramente, foi estudado o comportamento da expressão gênica do Bcl-2 e Bcl-xl, e Bax, caspase-3 e caspase-9 na medula espinhal dos ratos submetidos ao modelo proposto de TMA grave, proposto por Torres et al. (2010c), em relação à medula espinhal de animais não traumatizados. A mensuração por RT-PCR em tempo real foi realizada nas secções 4 mm cranial e 4 mm caudal ao epicentro da lesão.

Nos animais do grupo CP, não se observou diferença da expressão de Bcl-2 ( $p > 0,05$ ) em relação a expressão desse fator na medula espinhal íntegra dos animais do grupo CN, aos 30 dias de observação. Já a expressão gênica do Bcl-xl foi significativamente menor nos segmentos cranial ( $p < 0,001$ ) e caudal ( $p < 0,05$ ) do grupo CP em relação a sua expressão normal na medula espinhal íntegra dos animais do grupo CN, aos 30 dias de observação (Figura 15).

Quanto aos fatores pró-apoptóticos, nos animais do grupo CP, a expressão de Bax na secção caudal ao epicentro da lesão ( $p < 0,05$ ) e de caspase-3, tanto nos segmentos cranial ( $p < 0,05$ ) quanto caudal ( $p < 0,05$ ), foram significativamente maior que a expressão na medula espinhal íntegra dos animais do grupo CN, aos 30 dias de observação. A expressão de mRNA de Bax na secção cranial e da caspase-9, nas secções craniais e caudais, não mostraram-se diferentes ( $p > 0,05$ ) em relação à expressão na medula espinhal íntegra dos animais do grupo CN, aos 30 dias de observação (Figura 16).

A menor expressão endógena de mRNA do fator antiapoptótico Bcl-xl, e maior dos fatores pró-

apoptóticos caspase-3 e Bax, aos 30 dias após o TMA grave, sugere um mecanismo de ação patológico crônico, e indica mais um possível alvo para modulação terapêutica. O mesmo não parece acontecer com a expressão de Bcl-2 e caspase-9. Adicionalmente, nos achados do presente estudo, curiosamente, observaram-se menores níveis de fatores neurotróficos (Figura 13) e de antiapoptóticos (Figura 15) nos segmentos craniais e maiores de fatores pró-apoptóticos (Figura 16) nos caudais, dos animais do grupo CP.

Corroborando esses achados, Citron et al. (2000) e Dasari et al. (2007), demonstraram que as células nos segmentos caudais ao epicentro da lesão exibiram maior quantidade de células apoptóticas que as dos segmentos craniais. Portanto, essa observação pode indicar que maiores esforços devem ser direcionados aos mecanismos da lesão caudalmente ao epicentro, para recuperação precoce do paciente acometido.

Embora sejam poucos os estudos que investiguem o perfil comportamental das expressões gênica e proteica de fatores pró e antiapoptóticos, em modelos *in vivo* de TMA contusivo/compressivo, já foi demonstrado que, tanto os membros da família da caspase, principalmente a caspase-3 (Springer et al, 2000; McEwen e Springer, 2005; Springer et al., 2009), quanto os da família do Bcl-2, principalmente o Bax, (Kuwana e Newmeyer, 2003; Kotipatruni et al., 2011) estão suprarregulados na fase aguda. Além disso, medidas terapêuticas que visam o bloqueio dessa suprarregulação e/ou estimulem a hiperexpressão dos fatores antiapoptóticos, principalmente o Bcl-2, parecem ser capazes de inibir a propagação das vias efetoras da apoptose (Lou et al., 1998).



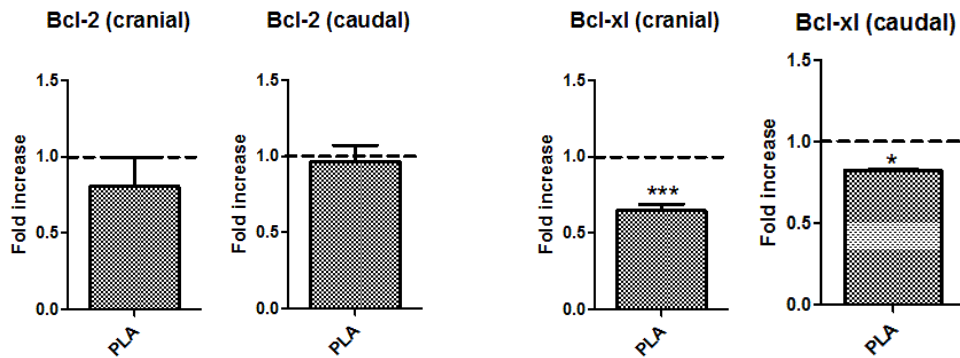


Figura 15 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-x1. Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo CP em relação ao grupo CN (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CP - controle positivo; CN - controle negativo. (\* p<0,05; \*\*\* p<0,001).

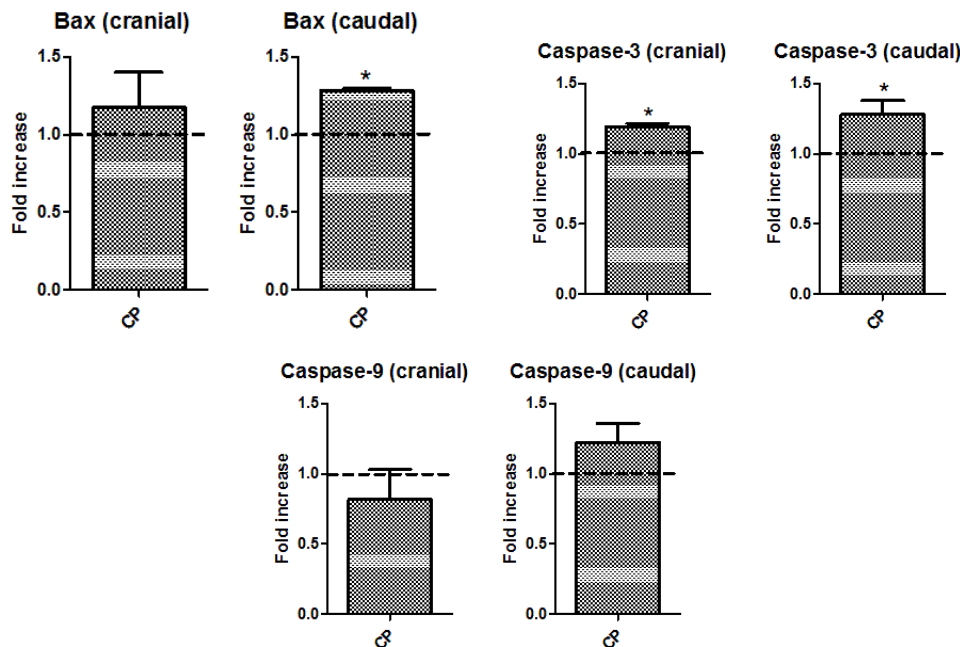


Figura 16 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores pró-apoptóticos Bax, caspase-3 e caspase-9. Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo CP em relação ao grupo CN (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CP - controle positivo; CN - controle negativo (\* p<0,05).

Sabe-se que as mitocôndrias desempenham papel importante na morte celular apoptótica, liberando proteínas efetoras, como o citocromo c, a partir do espaço intermembranoso mitocondrial (Kluck et al., 1997; Kuwana e Newmeyer, 2003). O citocromo c, por sua vez, irá estimular as vias efetoras da apoptose, via ativação das caspases 9 e 3 (Kluck et al., 1997). A permeabilização da membrana mitocondrial externa, e consequente

liberação do citocromo c, está diretamente relacionada com a perda do equilíbrio entre as proteínas pró e antiapoptóticas da família da Bcl-2, que pode ser induzida por uma variedade de estímulos, como a liberação excessiva de  $Ca^{2+}$  pelo retículo endoplasmático (Mody e MacDonald, 1995; Wei e Perry, 1996; Lou et al., 1998; Wei et al., 2000; Choi et al., 2003; Seki et al., 2003).

Os eventos envolvidos na apoptose são detectados pela imunistoquímica, com picos em oito e 24 horas, com um terceiro pico tardio aos sete dias pós-lesão (Lu et al., 2000; Seki et al., 2003). Talvez por isso, poucos estudos tem voltado atenção para a importância do processo apoptótico dando continuidade à degradação tecidual na fase crônica do TMA, impedindo brotamento de colaterais e / ou regeneração, e consequente estabelecimento da função perdida.

Adicionalmente, a maioria das pesquisas tem se preocupado em investigar a potencial capacidade das CTM de se transdiferenciarem, de se implantarem e estimularem e / ou carregarem neurotrofinas, o que justificaria seus efeitos neuroprotetores sobre crescimento axonal e brotamento de seus colaterais. Em contrapartida, poucos são os estudos *in vivo* de TMA que investigam se tais efeitos não poderiam estar relacionados com o potencial antiapoptótico das CTM sobre o tecido danificado (Dasari et al., 2007; Citron et al., 2000; Caldeira, 2011; Uccelli et al., 2011).

Por esse motivo, no presente estudo, também avaliaram-se os possíveis efeitos das CTM e do dantrolene, associados ou não, sobre o comportamento da expressão de mRNA dos fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-xl, e pró-apoptóticos Bax, caspase-3 e caspase-9, nos animais que sofreram TMA grave, no período crônico, 30 dias pós-trauma.

Embora a expressão de Bcl-2 dos animais do grupo CP não tenha sido diferente em relação a expressão na medula espinhal íntegra dos animais do grupo CN ( $p > 0,05$ ), após o tratamento com dantrolene, associado ou não às CTM (CTM+DAN e DAN) observaram-se maiores níveis de sua expressão nos segmentos craniais ao epicentro, 30 dias após o TMA. Em contrapartida, apesar dos animais do CP terem apresentado menor expressão de Bcl-xl em comparação aos animais do CN, somente os segmentos caudais dos animais tratados com CTM apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da expressão desse fator antiapoptótico, 30 dias após o TMA grave (Figura 17).

Em relação aos fatores pró-apoptóticos, a expressão gênica de Bax nos segmentos espinhais craniais e caudais ao epicentro da lesão dos animais tratados com CTM+DAN ( $p < 0,01$  e

$p < 0,05$ , respectivamente) ou DAN ( $p < 0,001$  em ambos segmentos) foi significativamente menor que dos animais do grupo CP, aos 30 dias de observação. A expressão das caspases 3 e 9 foi significativamente menor, nos segmentos craniais e caudais ao epicentro da lesão, nos animais tratados com dantrolene, CTM ou sua associação (CTM+DAN) ( $p < 0,05$ ), em comparação aos animais do CP, com exceção dos segmentos caudais dos animais que receberam somente CTM quanto a expressão de caspase-3, aos 30 dias de observação (Figura 18).

Seki et al. (2003) demonstraram pela primeira vez, em modelo *in vivo* de TMA, utilizando camundongos transgênicos para suprarregulação gênica de Bcl-2 humano, que 28 dias após a lesão esse fator foi localizado em células da glia, mas não em corpos neuronais, tanto na região do epicentro quanto nas adjacências craniais e caudais. A hiperexpressão de Bcl-2 foi associada com efeito neuroprotetor, pela diminuição de perda neuronal, mesmo não sendo notado melhora funcional nos testes comportamentais.

Já foram demonstrados os benefícios do dantrolene no tratamento de distúrbios inflamatórios mediados por citocinas (Hotchkiss et al., 1995), suas propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas (Büyükkuroglu, 2002; Gülçin et al., 2004) e antioxidantes (Büyükkuroglu et al., 2001; Büyükkuroglu et al., 2002; Ucuncu et al., 2005).

Além disso, Wei et al. (2000) demonstraram que o dantrolene foi capaz de aumentar a concentração de proteínas Bcl-2, conferindo efeito neuroprotetor em modelo *in vitro* de morte celular. O dantrolene e o Bcl-2 foram capazes de inibir a liberação excessiva do  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático e sua subsequente translocação para a mitocôndria, evitando assim a falência do potencial de membrana mitocondrial (Wei e Perry, 1996; Wei et al., 2000). Corroborando esses achados, Choi et al. (2003) demonstraram o efeito neuroprotetor do dantrolene em modelo de morte celular dopaminérgica ao reduzir o aumento da razão Bax / Bcl-2 induzida por concentrações tóxicas de  $Ca^{2+}$  intracitoplasmático.

Finalmente, foram elucidados os efeitos neuroprotetores do dantrolene em modelos *in vitro* de TMA (Thorell et al. 2002) e em lesão

espinhal por isquemia e reperfusão (Kocogullari et al. 2008). Entretanto, além do presente relato, poucos estudos *in vivo* foram realizados em TMA, demonstrando esses efeitos neuroprotetores. Aslan et al. (2009) observaram seus efeitos benéficos contra o estresse oxidativo, inibindo a morte neuronal em coelhos e, Torres et al. (2010a), pela primeira vez, elucidou o efeito antiapoptótico do dantrolene ao inibir caspase-3 neuronal em modelo contusivo/compressivo *in vivo* de TMA grave em ratos.

Quanto aos efeitos da terapia com CT sobre os mecanismos apoptóticos consequentes do TMA, Dasari et al. (2007) observaram que o transplante de CTM contribuiu com a restauração funcional de ratos traumatizados, por meio da combinação de regeneração neuronal, surgimento de oligodendrócitos ajudando na remielinização e inibindo apoptose neuronal e de oligodendrócitos, devido à infrarregulação da cascata de caspase-3, observados 14 dias após o transplante intravenoso das CTM.

O estudo de Caldeira (2011) demonstrou, em metodologia semelhante ao trabalho atual, recuperação neurológica precoce nos animais tratados com CTM e que, esse transplante foi capaz de reduzir a apoptose decorrente do TMA, pela redução nas expressões de Bax e Caspase-9, além de preservar e/ou estimular sinaptogênese. Em outro estudo, Oh et al. (2011) demonstraram aumento da expressão de Bcl-2 como uma das vias de ação neuroprotetora produzida pelo cotransplante de CTN e CTM para tratamento de ratos com TMA.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho, corroboram achados anteriores, e sugerem diversos mecanismos de neuroproteção, via suprarregulação de fatores antiapoptóticos e/ou infrarregulação de fatores pró-apoptóticos, pelo dantrolene e pelas CTM, em associação ou não, o que, possivelmente, justifica a melhora funcional sensorial e motora nos testes comportamentais e maior preservação neuronal nas adjacências do epicentro da lesão.

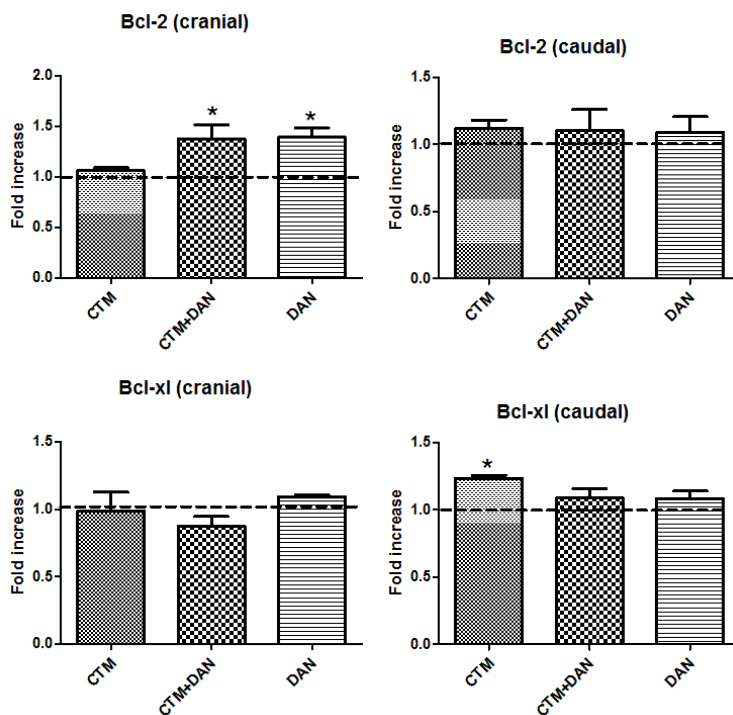


Figura 17 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-x1. Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, dos grupos CTM, CTM+DAN e DAN em relação ao grupo CP (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CTM – células-tronco mesenquimais; CTM+DAN - células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene; DAN – dantrolene; CP - controle positivo (\* p<0,05).

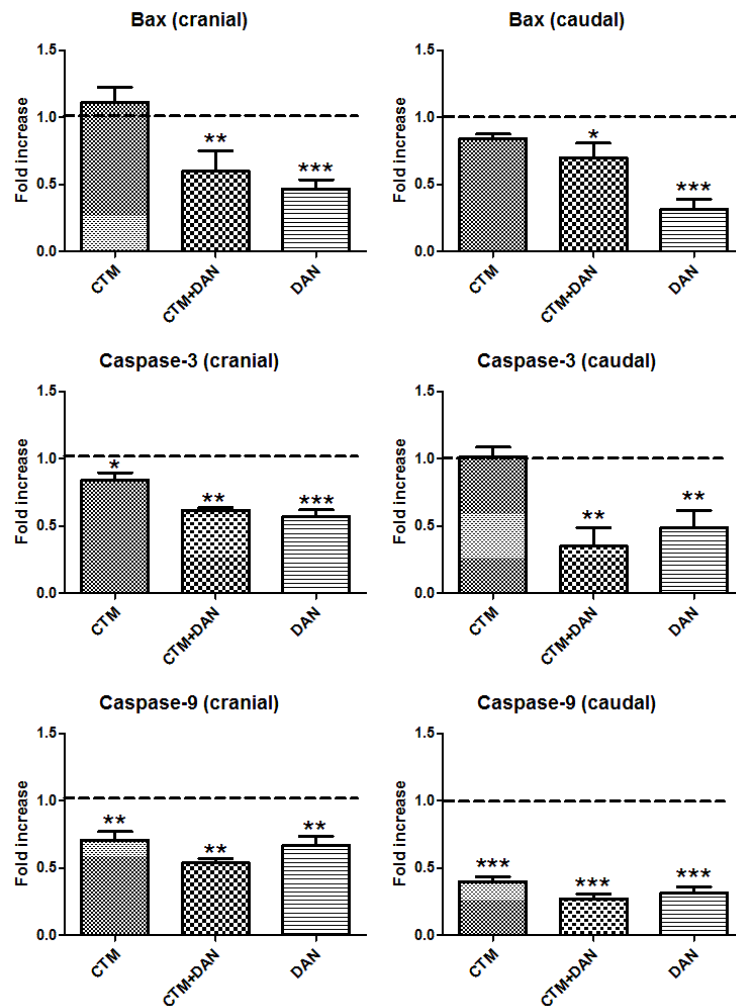


Figura 18 - Mensuração por RT-PCR em tempo real da expressão dos fatores pró-apoptóticos Caspase-3, Caspase-9 e Bax. Comparação da razão (*fold increase*) dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, dos grupos CTM, CTM+DAN e DAN em relação ao grupo CP (nível basal = 1), nos segmentos cranial e caudal ao epicentro da lesão medular de ratos Wistar, observados 30 dias após o trauma medular. CTM – células-tronco mesenquimais; CTM+DAN - células-tronco mesenquimais associadas ao dantrolene; DAN – dantrolene; CP - controle positivo (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001).

## 7. PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou que o dantrolene, as CTM e associação de ambos, apresentaram efeitos neuroprotetores ao restabelecer parcialmente a função motora e sensorial, inibir a morte neuronal, diminuir a apoptose do tecido medular e elevar a produção de fatores neurotróficos de ratos Wistar 30 dias após a TMA contusivo/compressivo grave.

Algumas questões permanecem para serem esclarecidas em futuros estudos nessa mesma

linha de pesquisa: Qual porcentagem de CT atinge o foco da lesão? Qual o tempo de sua viabilidade local? Possuem capacidade de implantação e / ou diferenciação em fenótipos neurais? Além disso, qual o melhor momento para aplicação do dantrolene e do transplante celular? Qual a dose e / ou concentração, bem como o número de aplicações dos mesmos? Para responder essas e muitas outras questões, diferentes tempos de observação clínica e patológica dos animais são necessárias, além do que, a quantificação da expressão proteica pode

ajudar a esclarecer as ações neuroprotetoras encontradas no estudo ora relatado.

Esse é um dos poucos estudos mostrando a interação do uso de um fármaco neuroprotetor em associação à CTM em modelo *in vivo* de TMA contusivo/compressivo grave em ratos.

Com o avanço da ciência, espera-se que o melhor entendimento da patogenia das doenças neurológicas, como do TMA, e da interação das CT com os tecidos receptores, associadas ou não a agentes farmacoterapêuticos, permitam que o dano neurológico seja revertido, resultando em recuperação funcional e, principalmente, melhorando segura e substancialmente a qualidade de vida dos pacientes.

A segurança clínica e propriedades neuroprotetoras do dantrolene no TMA fazem dele uma terapia promissora nestas situações, devido à sua capacidade para inibir simultaneamente várias vias envolvidas na disfunção e morte celular. Já o potencial da terapia com CT apresenta questões clínicas e técnicas que necessitam de esclarecimento antes que testes clínicos em humanos possam ser realizados com segurança. Talvez nem todos os questionamentos atuais sejam respondidos, principalmente, no que se diz respeito aos mecanismos moleculares de sua ação, mas devem haver claras evidências de que seu uso seja seguro, melhore a função perdida e forneça benefícios que superem os riscos. Estudos pré-clínicos são essenciais para responder algumas perguntas, mesmo embora algumas questões não poderão ser simplesmente traduzidas de espécies animais para as condições humanas.

## 8. CONCLUSÕES

Pode-se concluir no presente estudo que o modelo de trauma medular agudo contusivo / compressivo grave reproduzido em ratos Wistar adultos promove paraplegia de membros pélvicos, lesão espinhal grave, caracterizada por degeneração axonal e perda neuronal, que se estendem craniocaudalmente, diminuição da expressão gênica das neurotrofinas BDNF e NT-3, diminuição da expressão gênica do fator antiapoptótico Bcl-xl e aumento da expressão gênica dos fatores pró-apoptóticos caspase-3 e Bax.

Além disso, o dantrolene, em dose única de 10 mg/kg, pela via intraperitoneal, uma hora após o TMA, as CTM, em aplicação única de  $1 \times 10^6$  células por via intravenosa, sete dias após o TMA, ou associação de ambos para tratamento de ratos submetidos ao trauma contusivo / compressivo da medula espinhal, e observados durante 30 dias são protocolos seguros e não apresentam efeitos sistêmicos deletérios. Além disso, promovem recuperação funcional parcial, apresentam efeito neuroprotetor, conferido pela maior preservação neuronal e maior expressão gênica da neurotrofina BDNF, e efeito antiapoptótico, conferido pela menor expressão gênica dos fatores pró-apoptóticos caspase-9 e caspase-3.

Somente o dantrolene, associado ou não as CTM, apresenta efeito neuroprotetor e antiapoptótico, conferidos pela maior expressão gênica dos fatores neurotrófico NT-3 e antiapoptótico Bcl-2, e menor expressão gênica do fator pró-apoptótico Bax.

Somente as CTM apresentam efeito antiapoptótico, conferido pela maior expressão gênica do fator antiapoptótico Bcl-xl.

## 9. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, D. K.; WATERS, T. R.; MEANS, E. D. Pretreatment with alphatocopherol enhances neurologic recovery after experimental spinal cord compression injury. *J. Neurotrauma*, v.5, p.61–68, 1988.
- ANKENY, D. P.; MCTIGUE, D. M.; JAKEMAN, L. B. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.*, v.190, p.17–31, 2004.
- ASLAN, A.; CEMEK, M.; BÜYÜKOKUROGLU, M. E.; et al. Dantrolene can reduce secondary damage after spinal cord injury. *Eur. Spine J.*, v.18, p.1442–1451, 2009.
- AYAR, A.; KELESTIMUR, H. The inhibitory effects of dantrolene on action potential-induced calcium transients in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Physiol. Res.*, v.51, n.4, p.341–346, 2002.

- 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.
- BARNABÉ-HEIDER, F.; FRISÉN, J. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell.*, v.3, n.1, p.16-24, 2008.
- 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. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.*, v.139, p.244–256, 1996.
- BEATTIE, M. S. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *Trends Mol. Med.*, v.10, n.12, p.580-583, 2004.
- BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. A review of experimental and clinical treatments for acute spinal cord injury. *Vet. Med.*, v.95, n.11, p.855-866, 2000.
- BOWMAN, W. C.; HOUSTON, J.; KHAN, H. H.; et al. Effects of dantrolene sodium on respiratory and other muscles and on respiratory parameters in the anaesthetised cat. *Eur. J. Pharmacol.*, v.55, n.3, p.293-303, 1979.
- BRANDON, B. W.; LARACH, M. G. The North American Malignant Hyperthermia Registry. Reassessment of the safety and efficacy of dantrolene. *Anesthesiol.*, v.96, p.A1199, 2002.
- BREGMAN, B. S.; BROUDE, E.; MCATEE, M.; et al. Transplants and neurotrophic factors prevent atrophy of mature CNS neurons after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.149, n.1, p.13-27, 1998.
- BREGMAN, B. S.; MCATEE, M.; DAI, H. N.; et al. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp. Neurol.*, v.148, p.475-498, 1997.
- 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.
- BÜYÜKOKUROGLU, M. E. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of dantrolene sodium in rats and mice. *Pharmacol. Res.*, v.45, n.6, p.455-460, 2002.
- BÜYÜKOKUROGLU, M. E.; GULÇIN, I.; OKTAY, M.; et al. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol. Res.*, v.44, n.6, p.491-494, 2001.
- BÜYÜKOKUROGLU, M. E.; TAYSI, S.; POLAT, F.; et al. Mechanisms of the beneficial effects of dantrolene sodium on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Pharmacol. Res.*, v.45, n.5, p.421-425, 2002.
- CALDEIRA, F. M. C. *Células-tronco mesenquimais indiferenciadas no tratamento do trauma medular espinal de ratos Lewis*. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal. Belo Horizonte, Escola de Veterinária - UFMG, 2011. 100p.
- CARLSON, S.; PARRISH, M. E.; SPRINGER, J. E.; et al. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.*, v.151, n.1, p.77-88, 1998.
- 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, v.1, p.01-11, 2004.
- CHACÓN, S. C.; NIETO-SAMPEDRO, M. Pathophysiology of spinal cord injury. A review. *Vet. Mex.*, v.36, n.1, p.75-86, 2005.
- CHEN, C. J.; OU, Y. C.; LIAO, S. L.; et al. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp. Neurol.*, v.204, p.443-453, 2007.

- CHEREDNICHENKO, G.; WARD, C. W.; FENG, F.; et al. Enhanced excitation-coupled calcium entry in myotubes expressing malignant hyperthermia mutation R163c is attenuated by dantrolene. *Mol. Pharmacol.*, v.73, p.1203–1212, 2008.
- CHOI, H. J.; KIM, S. W.; LEE, S. Y.; et al. Involvement of apoptosis and calcium mobilization in tetrahydrobiopterin-induced dopaminergic cell death. *Exp. Neurol.*, v.181, n.2, p.281-290, 2003.
- CITRON, B. A.; ARNOLD, P. M.; SEBASTIAN, C.; et al. Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Exp Neurol.*, v.166, p.213–226, 2000.
- COUMANS, J. V.; LIN, T. T.; DAI, H. N.; et al. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J. Neurosci.*, v.21, n.23, 9334-9344, 2001.
- COUTTS, M.; KEIRSTEAD, H. S. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v.209, n. 2, p.368-377, 2008.
- CROWE, M. J.; BRESNAHAN, J. C.; SHUMAN, S. L.; et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat. Med.*, v.3, p.73–76, 1997.
- DASARI, V. R.; SPOMAR, D. G.; CADY, C.; et al. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res.*, v.32, n.12, p.2080-2093, 2007.
- DELAMANTER, R. B.; SHERMAN, J.; CARR, J. B. Pathophysiology of spinal cord injury. Recovery after immediate and delayed decompression. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.77, n.7, p.1042-1049, 1995.
- DENT, M. A.; SEGURA-ANAYA, E.; ALVA-MEDINA, J.; et al. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett.*, v.584, n.13, p.2767-2771, 2010.
- DINKEL, K.; MACPHERSON, A.; SAPOLSKY, R. M. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J. Neurochem.*, v.84, n.4, p.705-716, 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.
- DREDGE, B. K.; JENSEN, K. B. NeuN/Rbfox3 nuclear and cytoplasmic isoforms differentially regulate alternative splicing and nonsense-mediated decay of Rbfox2. *PLoS One*. v.6, n.6, p.e21585, 2011.
- DUMONT, R. J.; VERMA, S.; OKONKWO, D. O.; et al. Acute spinal cord injury, Part II: Contemporary pharmacotherapy. *Clin. Neuropharmacol.*, v.24, n.5, p.265-279, 2001.
- DÜZENLI, S.; BAKURIDZE, K.; GEPDIREMEN, A. The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. *Toxicol. In Vitro*, v.19, n.5, p.589-594, 2005.
- EDWARDS, J. G. T.; NEWTON, J. R.; RAMZAN, R. C.; et al. The efficacy of dantrolene sodium in controlling exertional rhabdomyolysis in the Thoroughbred racehorse. *Equine Vet. J.*, v.35, n.7, p.707-711, 2003.
- EDWARDS, P.; ARANGO, M.; BALICA, L. Final results of MRC CRASH, a randomized placebo controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet.*, v.365, n.9475, p.1957-1959, 2005.
- EIDELBERG, E.; STRAEHLEY, D.; ERSPAMER, R.; et al. Relationship between residual hindlimb-assisted locomotion and surviving axons after incomplete spinal cord injuries. *Exp. Neurol.*, v.56, n.2, p.312-322, 1977.
- EGGENHOFER, E.; BENSELER, V.; KROEMER, A.; et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the

- lungs after intravenous infusion. *Front Immunol.*, v.3, p.297, 2012.
- ELLIS, K. O.; CARPENTER, J. F. A comparative study of dantrolene sodium and other skeletal muscle relaxants with the Straub tail mouse. *Neuropharmacol.*, v.13, p.211-214, 1974.
- FADEN, A. I.; LEMKE, M.; SIMON, R. P.; et al. N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome after traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic, and neurochemical studies. *J. Neurotrauma*, v.5, p.33-45, 1988.
- FAROOQUE, M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta Neuropathol.*, v.100, n.1, p.13-22, 2000.
- FEE, D. B.; SWARTZ, K. R.; JOY, K. M.; et al. Effects of progesterone on experimental spinal cord injury. *Brain Res.*, v.1137, n.1, p.146-152, 2007.
- FEHLINGS, M. G.; TATOR, C. H. The relationships 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.
- FERNANDEZ, E.; MANNINO, S.; TUFO, T.; et al. The Adult "paraplegic" rat: treatment with cell graftings. *Surg. Neurol.*, v.65, n.3, p.223-237, 2006.
- FORTIER, L. A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.*, v.34, n.5, p.415-423, 2005.
- FOURNIER, P. Dossier toxicologique, pharmacologique, pharmacocinétique du Dantrium IV. *Dantrium et hyperthermie maligne*. Lyon, Laboratoire Oberval (Unpublished internal report), 1982.
- 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.
- GEISLER, F. H.; DORSEY, F. C.; COLEMAN, W. P. Recovery of motor function after spinal cord injury—a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *N. Engl. J. Med.*, v.324, p.1829-1838, 1991.
- GENOVESE, T.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; et al. Increased oxidative-related mechanisms in the spinal cord in old rats. *Neurosci. Lett.*, v.393, n.2, p.141-146, 2006.
- GEPDIREMEN, A.; DÜZENLI, S.; HACIMÜFTÜOĞLU, A.; et al. The effects of dantrolene alone or in combination with nimodipine in glutamate-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell cultures of rat pups. *Pharmacol. Res.*, v.43, n.3, p.241-244, 2001.
- GERIN, C. G.; MADUEKE, I. C.; PERKINS, T.; et al. Combination strategies for repair, plasticity, and regeneration using regulation of gene expression during the chronic phase after spinal cord injury. *Synapse*, v.65, n.12, p.1255-1281, 2011.
- GIGLIO, C. A.; DEFINO, H. L. A.; 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, n.12, p.1613-1623, 2006.
- GOLDBERG, J. L. How does axon grow? *Genes Dev.*, v.17, n.8, p.941-958, 2003.
- GRUNER, J. A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma*, v.9, n.2, p.123-126, 1992.
- GÜLÇİN, I.; BEYDEMİR, S.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. E. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biol. Pharm. Bull.*, v.27, n.5, p.613-616, 2004.
- HACKLER, R. H.; BROECKER, B. H.; KLEIN, F. A.; et al. A clinical experience with dantrolene sodium for external urinary sphincter hypertonicity in spinal cord injured patients. *J. Urol.*, v.124, n.1, p.78-81, 1980.
- HALL, E. D. Effects of the 21-aminosteroid U-74006F on posttraumatic spinal cord ischemia in cats. *J. Neurosurg.*, v.68, p.462-465, 1988.



- HAPPEL, R. D.; SMITH, K. P.; BANIK, N. L.; et al. Ca<sup>2+</sup>-accumulation in experimental spinal cord trauma. *Brain Res.*, v.211, p.476–479, 1981.
- HARRISON, G. G. Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br. J. Anaesth.*, v.81, n.4, p.626-629, 1998.
- HE, B. L.; BA, Y. C.; WANG, X. Y.; et al. BDNF expression with functional improvement in transected spinal cord treated with neural stem cells in adult rats. *Neuropeptides*. v.47, n.1, p.1-7, 2013.
- HELL, R. C. R.; COSTA, M. M. S.; GOES, A. M.; et al. Local injection BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptogenesis following ventral root avulsion. *Neurobiol Dis.*, v.33, n.2, p.290-300, 2009.
- 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.
- HOLLIS II, E. R.; TUSZYNSKI, M. H. Neurotrophins: potential therapeutic tools for the treatment of spinal cord injury. *Neurotherapeutics.*, v.8, n.4, p.694-703, 2011.
- HOTCHKISS, R. S.; OSBORNE, D. F.; LAPPAS, G. D.; et al. Calcium antagonists decrease plasma and tissue concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$ , and interleukin-1  $\alpha$  in a mouse model of endotoxin. *Shock*, v.3, n.5, p.337-342, 1995.
- IKEDA, O.; MURAKAMI, M.; INO, H.; et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on compression-induced spinal cord injury: BDNF attenuates down-regulation of superoxide dismutase expression and promotes up-regulation of myelin basic protein expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.61, n.2, p.142-153, 2002.
- IKEDA, O.; MURAKAMI, M.; INO, H.; et al. Acute up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression resulting from experimentally induced injury in the rat spinal cord. *Acta Neuropathol.*, v.102, p.239-245, 2001.
- 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.
- JAERVE, A.; SCHIRA, J.; MÜLLER, H. W. Concise review: the potential of stromal cell-derived factor 1 and its receptors to promote stem cell functions in spinal cord repair. *Stem Cells Transl. Med.*, v.1, n10, p.732-739, 2012.
- JEFFERY, N. D.; BLAKEMORE, W. F. Spinal cord injury in small animals. Mechanisms of spontaneous recovery. *Vet. Rec.*, v.144, n.15, p.407-413, 1999.
- KAJIHARA, K.; KAWANAGA, H.; DE LA TORRE, J. C.; et al. Dimethyl sulfoxide in the treatment of experimental acute spinal cord injury. *Surg. Neurol.*, v.1, n.1, p.16-22, 1973.
- KANG, E. S.; HA, K. Y.; KIM, Y. H. Fate of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells following spinal cord injury in rats by transplantation routes. *J. Korean Med Sci.*, v.27, n.6, p.586-593, 2012.
- KAPTANOGLU, E.; BESKONAKLI, E.; OKUTAN, O.; et al. Effect of magnesium sulphate in experimental spinal cord injury: evaluation with ultrastructural findings and early clinical results. *J. Clin. Neurosci.*, v.10, n.3, p.329-334, 2003.
- KHALAF, I. M.; FOLEY, G.; ELHILALI, M. M. The effect of dantrium on the canine urethral pressure profile. *Invest. Urol.*, v.17, n.3, p.188-190, 1979.
- 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*, v.27, n.1, p.131-138, 2010.
- KIM, J. Y.; CHUN, S.; BANG, M. S.; et al. Safety of low-dose oral dantrolene sodium on hepatic function. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, v.92, n.9, p.1359-1363, 2011.

- KIM, J. W.; HA, K. Y.; MOLON, J. N.; et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intraslesional and intravenous transplantation. *Spine*, v.38, n.17, p.E1065-1074, 2013.
- KIM, K. K.; ADELSTEIN, R. S.; KAWAMOTO, S. Identification of Neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J. Biol. Chem.*, v.284, p.31052–31061, 2009.
- KING, A. L. *Physiological and Clinical Anatomy of the Domestic Mammals: Central Nervous System*. Oxford: Willey, 1999. 336p.
- KLUCK, R. M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D. R.; et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, v.275, p.1132-1136, 1997.
- KOBAYASHI, S.; BANNISTER, M. L.; GANGOPADHYAY, J. P.; et al. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*, v.280, n.8, p.6580-6587, 2005.
- KOCOGULLARI, C. U.; EMMILER, M.; CEMEK, M.; et al. Can dantrolene protect spinal cord against ischemia/reperfusion injury? An experimental study. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v.56, p.406–411, 2008.
- KOTIPATRUNI, R. R.; DASARI, V. R.; VEERAVALLI, K. K.; et al. p53- and Bax-mediated apoptosis in injured rat spinal cord. *Neurochem. Res.*, v.36, n11, p.2063-2074, 2011.
- KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M. U.; FIEGE, M.; et al. Dantrolene – A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesth.*, v.59, n.4, p.364-373, 2004.
- KUWANA, T.; NEWMeyer, D. D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.15, n.6, p.691-699, 2003.
- KWON, B. K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J. N.; et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.*, v.4, n.4, p.451-464, 2004.
- LAVEZZI, A. M.; CORNA, M. F.; MATTURRI, L. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death. *J. Neurol. Sci.*, v.329, n.1-2, p.45-50, 2013.
- LI, F.; HAYASHI, T.; JIN, G.; et al. The protective effect of dantrolene on ischemic neuronal cell death is associated with reduced expression of endoplasmic reticulum stress markers. *Brain Res.*, v.1048, n.1-2, p.59-68, 2005.
- 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.
- 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.
- LIU, X. Z.; XU, X. M.; HU, R.; et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v.17, p.5395–5406, 1997.
- LIU, Y.; HIMES, B. T.; SOLOWSKA, J.; et al. Intraspinal delivery of neurotrophin-3 using neural stem cells genetically modified by recombinant retrovirus. *Exp. Neurol.*, v.158, n.1, p.9-26, 1999.
- 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.
- LOU, J.; LENKE, L. G.; XU, F.; et al. *In vivo* Bcl-2 oncogene neuronal expression in the rat spinal cord. *Spine*, v.23, n.5, p.517-523, 1998.
- LU, J.; ASHWELL, K. W. S.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury – role of apoptosis. *Spine*, v.25, n.14, 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, 2005.
- 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.
- MA, M.; BASSO, D. M.; WALTERS, P.; et al. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57BI/6 mouse. *Exp. Neurol.*, v.169, n.2, p.239-254, 2001.
- MAKAREWICZ, D.; ZIEMIŃSKA, E.; ŁAZAREWICZ, J. W. Dantrolene inhibits NMDA-induced  $45\text{Ca}$  uptake in cultured cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.*, v.43, n.4-5, p.273-278, 2003.
- MARTINS, B. D. C. *Efeitos da associação do riluzol ao dantrolene em ratos submetidos ao trauma medular agudo*. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal. Belo Horizonte, Escola de Veterinária UFMG, 2012. 70p.
- MARTINS, B. D. C.; TORRES, B. B. J.; MARTINS, G. D. C.; et al. Avaliação da capacidade motora em campo aberto de ratos submetidos a trauma medular agudo e tratados com associação de riluzol e dantrolene. *MEDVEP*, v.9, 469-499, 2011.
- MATSUMOTO, T.; TAMAKI, T.; KAWAKAMI, M.; et al. Early complications of high-dose methylprednisolone sodium treatment in the follow-up of acute cervical spinal cord injury. *Spine*, v.26, n.4, p.426-430, 2001.
- MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v.1, p.120-129, 2000.
- MCCALL, J.; WEIDNER, N.; BLESCH, A. Neurotrophic factors in combinatorial approaches for spinal cord regeneration. *Cell Tissue Res.*, v.349, n.1, p.27-37, 2012.
- MCEWEN, M. L.; SPRINGER, J. E. A mapping study of caspase-3 activation following acute spinal cord contusion in rats. *J. Histochem. Cytochem.*, v.53, p.809-819, 2005.
- METZ, G.A.S.; MERKLER, D.; DIETZ, V.; et al. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.*, v.883, n.2, p.165-177, 2000.
- 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.
- MODY, I.; MACDONALD, J. F. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Trends Pharmacol. Sci.*, v.16, n.10, p.356-359, 1995.
- MUIR, G. D.; WEBB, A. A. Assessment of behavioral recovery following spinal cord injury in rats. *Eur. J. Neurosci.*, v.12, n.9, p.3079-3086, 2000.
- 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.
- NAKAYAMA, R.; YANO, T.; USHIJIMA, K.; et al. Effects of dantrolene on extracellular glutamate concentration and neuronal death in the rat hippocampal CA1 region subjected to transient ischemia. *Anesthesiol.*, v.96, n.3, p.705-710, 2002.
- NIEBAUER, M.; GRUENTHAL, M. Neuroprotective effects of early vs. late administration of dantrolene in experimental status epilepticus. *Neuropharmacol.*, v.38, n.9, p.1343-1348, 1999.
- OLSSON, Y.; SHARMA, H. S.; NYBERG, F.; et al. The opioid receptor antagonist naloxone influences the pathophysiology of spinal cord

- injury. *Prog. Brain Res.*, v.104, p.381–399, 1995.
- OH, J. S.; KIM, K. N.; AN, S. S.; et al. Cotransplantation of mouse neural stem cells (mNSCs) with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improves mNSC survival in a rat spinal cord injury model. *Cell Transplant.*, v.20, n.6, p.837-849, 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.
- OLIVERI, R. S.; BELLO, S.; BIERING-SORENSEN, F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: Systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiol Dis.*, v.62C, p.338-353, 2013.
- ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v.4, p.552–565, 2003.
- OSAKA, M.; HONMOU, O.; MURAKAMI, T.; et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res.*, v.1343, p.226-235, 2010.
- PAUL-PLATZER, K.; YAMAMOTO, T.; IKEMOTO, N.; et al. Probing a putative dantrolene-binding site on the cardiac ryanodine receptor. *Biochem. J.*, v.387, p.905-909, 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.
- PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, p.143-147, 1999.
- PITTS, L. H.; ROSS, A.; CHASE, G. A.; et al. Treatment with thyrotropinreleasing hormone (TRH) in patients with traumatic spinal cord injuries. *J. Neurotrauma*, v.12, p.235–243, 1995.
- POPESCU, B. O.; OPRICA, M.; SAJIN, M.; et al. Dantrolene protects neurons against kainic acid induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Cell. Mol. Med.*, v.6, n.4, p.555-569, 2002.
- QÍAO, F.; ATKINSON, C.; SONG, H. et al. Complement plays an important role in spinal cord injury and represents a therapeutic target for improving recovery following trauma. *Am. J. Pathol.*, v.169, n.3, p.1039-1047, 2006.
- QIN, D. X.; ZOU, X. L.; LUO, W.; et al. Expression of some neurotrophins in the spinal motoneurons after cord hemisection in adult rats. *Neurosci Lett.*, v.410, n.3, p.222-227, 2006.
- RADOJICIC, M.; REIER, P. J.; STEWARD, O.; et al. Septations in chronic spinal cord injury cavities contain axons. *Exp. Neurol.*, v.196, p.339-341, 2005.
- RESNICK, D. K.; GRAHAM, S. H.; DIXON, C. E.; et al. Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v.15, p.1005–1013, 1998.
- 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.
- ROONEY, G. E.; HOWARD, L.; O'BRIEN, T.; et al. Elevation of cAMP in mesenchymal stem cells transiently upregulates neural markers rather than inducing neural differentiation. *Stem Cells Development*, v.18, n.3, p.387-398, 2009a.
- ROONEY, G. E.; MCMAHON, S. S.; RITTER, T.; et al. Neurotrophic factor-expressing mesenchymal stem cells survive transplantation into the contused spinal cord without differentiating into neural cells. *Tissue Eng.*, v.15, n.10, p.3049-3059, 2009b.
- SAFFORD, K. M.; SAFFORD, S. D.; GIMBLE, J. M.; et al. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult

- stromal cells. *Exp. Neurol.*, v.187, p.319– 328, 2004.
- SASAKI, M.; RADTKE, C.; TAN, A. M.; et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J Neurosci.*, v.29, p.14932-14941, 2009.
- SAYER, F. T.; KRONVALL, E.; NILSSON, O. G. Methylprednisolone treatment in acute spinal cord injury: the myth challenged through a structured analysis of published literature. *Spine J.*, v.6, n.3, p.335-343, 2006.
- SCARISBRICK, I. A.; ISACKSON, P. J.; WINDEBANK, A. J. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the adult rat spinal cord: regulation by the glutamate receptor agonist kainic acid. *J Neurosci.*, v.19, n.18, p.7757-7769, 1999.
- SCHWAB, M. E. Repairing the injured spinal cord. *Science*, v.295, n.5557, p.1029-1031, 2002.
- SEKI, T.; HIDA, K.; TADA, M.; et al. Role of the bcl-2 gene after contusive spinal cord injury in mice. *Neurosurg.*, v.53, n.1, p.192-198, 2003.
- SHIN, D. A.; KIM, J. M.; KIM, H. I.; et al. Comparison of functional and histological outcomes after intralesional, intracisternal, and intravenous transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Acta Neurochir.*, v.155, n.10, p.1943-1950, 2013.
- 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. Zootec.*, v.60, n.3, p. 641-650, 2008.
- SILVERMAN, H.; HIKIDA, R. S. Membrane systems of avian hepatocytes during chronic exposure to dantrolene sodium: a morphometric, ultrastructural and histochemical study. *Tissue Cell.*, v.9, n.3, p.507-520, 1977.
- SNYDER, H. R.; DAVIS, C. S.; BICKERTON, R. K.; et al. 1-((5-arylfurfurylidene) amino)-hydantoins. A new class of muscle relaxants. *J. Med. Chem.*, v.10, p.807-810, 1967.
- SPRINGER, J. E.; AZBILL, R. D.; KNAPP, P. E. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat. Med.*, v.5, p.943–946, 2009.
- SPRINGER, J. E.; AZBILL, R. D.; NOTTINGHAM, S. A.; et al. Calcineurin mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v.20, p.7246–7251, 2000.
- SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; DELAHUNTA, A. Injuries to the central nervous system. In: \_\_\_\_. *Veterinary neuropathology*. St. Louis: Ed. Mosby, 1995. p.189-207.
- TAGAKI, T.; TAKAYASU, M.; MIZUNO, M.; et al. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, v.43, p.20–30, 2003.
- TAKEUCHI, H.; NATSUME, A.; WAKABAYASHI, T.; et al. Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1- and HGF-dependent manner. *Neurosci. Lett.*, v.426, p.69-74, 2007.
- TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Prog. Neurobiol.*, v.56, n.3, p.341-358, 1998.
- THORELL, W. E.; LEIBROCK, L. G.; AGRAWAL, S. K. Role of RYRs and IP3 receptors after traumatic injury to spinal cord white matter. *J. Neurotrauma*, v.19, p.335–342, 2002.
- 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.
- TODD, A. J.; SPIKE, R. C.; POLGÁR, E. A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin SST2A receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience.*, v.85, n.2, p.459-473, 1998.
- 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, 2010a.
- TORRES, B. B. J.; CALDEIRA, F. M. C.; OLIVEIRA, K. M.; et al. Trauma medular em animais de companhia. *Clín. Vet.* (São Paulo), v.87, p.72 – 86, 2010b.
- 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. Células-Tronco nas Doenças Neurológicas. In: ROZA, M. R.; OLIVEIRA, A. L. A.; DE NARDI, A. B.; et al. *Dia-a-dia tópicos selecionados em especialidades veterinárias*. Curitiba: Medvep, 2013a. p.285-286.
- TORRES, B. B. J. Glicocorticoides nas Afecções Neurológicas. In: ROZA, M. R.; OLIVEIRA, A. L. A.; DE NARDI, A. B.; et al. *Dia-a-dia tópicos selecionados em especialidades veterinárias*. Curitiba: Medvep, 2013b. p.283-284.
- TORRES, B. B. J.; SERAKIDES, R.; CALDEIRA, F. M. C.; et al. The ameliorating effect of dantrolene on the morphology of urinary bladder in spinal cord injured rats. *Pathol. Res. Pract.*, v.207, n.12, p.775-779, 2011.
- TORRES, B. B. J.; SILVA, C. M. O.; ALMEIDA, A. E. R. F.; et al. Experimental model of acute spinal cord injury produced by modified steriotaxic equipment. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.1, p.92-99, 2010c.
- TROPEL, P.; NOËL, D.; PLATET, N.; et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell Res.*, v.295, p.395– 406, 2004.
- TSUTSUMI, S.; UETA, T.; SHIBA, K.; et al. Effects of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study of high-dose methylprednisolone therapy on acute cervical spinal cord injury-results in spinal injuries center. *Spine*, v.31, n.26, p.2992-2996, 2006.
- TYSSELING, V. M.; MITHAL, D.; SAHNI, V.; et al. SDF1 in the dorsal corticospinal tract promotes CXCR4+ cell migration after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation*, v.8, p.16, 2011.
- UCCELLI, A.; BENVENUTO, F.; LARONI, A.; et al. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, v.24, n.1, p.59-64, 2011.
- UCUNCU, H.; TAYSI, S.; AKTAN, B.; et al. Effect of dantrolene on lipid peroxidation, luthathione and glutathione-dependent enzyme activities in experimental otitis media with efusión in guinea pigs. *Hum. Exp. Toxicol.*, v.24, n.11, p.567-571, 2005.
- ÜNAL-ÇEVİK, I.; KILINÇ, M.; GÜRSOY-ÖZDEMİR, Y.; et al. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.*, v.1015, n.1-2, p.169-174, 2004.
- 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.; SUNDSTRÖM, E. Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp. Neurol.*, v.145, n.2, p.502- 510, 1997.
- WANG, H.; YUAN, G.; PRABHAKAR, N. R.; et al. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from PC12 cells in response to oxidative stress requires autocrine dopamine signaling. *J. Neurochem.*, v.96, n.3, p. 694-705, 2006.

- WANG, N.; SUN, C.; HUO, S.; et al. Cooperation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and basic fibroblast growth factor in the neural differentiation of mesenchymal stem cells *in vitro*. *Int J Biochem Cell Biol*, n.40, p.294–306, 2008.
- WANG, X.; BUTOWT, R.; VASKO, M. R.; et al. Mechanisms of the release of anterogradely transported neurotrophin-3 from axon terminals. *J. Neurosci.*, v.22, n.3, p. 931-945, 2002.
- WARD, A.; CHAFFMAN, M. O.; SORKIN, E. M. Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. *Drugs.*, v.32, n.2, p.130-168, 1986.
- WEI, H.; LEEDS, P.; CHEN, R. W.; et al. Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentrations of 3-hydroxykynurenine: characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression. *J. Neurochem.*, v.75, n.1, p.81-90, 2000.
- WEI, H.; PERRY, D. C. Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J. Neurochem.*, v.67, n.6, p.2390-2398, 1996.
- WOLF, H. K.; BUSLEI, R.; SCHMIDT-KASTNER, R.; et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J. Histochem. Cytochem.*, v.44, n.10, p.1167-1171, 1996.
- WOODBURY, D.; SCHWARZ, E. J.; PROCKOP, D. J.; et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.*, v.61, p.364-370, 2000.
- WU, Y.; SATKUNENDRARAJAH, K.; TENG, Y.; et al. Delayed post-injury administration of riluzole is neuroprotective in a preclinical rodent model of cervical spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v.30, n.6, p.441-452, 2013.
- XU, G. P.; DAVE, K. R.; VIVERO, R.; et al. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res.*, n.952, p.153-158, 2002.
- XU, G. Y.; LIU, S.; HUGHES, M. G.; et al. Glutamate-induced losses of oligodendrocytes and neurons and activation of caspase-3 in the rat spinal cord. *Neurosci.*, v.153, p.1034–1047, 2008.
- XU, W.; LI, P.; QIN, K.; et al. miR-124 regulates neural stem cells in the treatment of spinal cord injury. *Neurosci. Lett.*, v.529, n.1, p.12-17, 2012.
- YANO, T.; NAKAYAMA, R.; IMAIZUMI, T.; et al. Dantrolene ameliorates delayed cell death and concomitant DNA fragmentation in the rat hippocampal Ca1 neurons subjected to mild ischemia. *Resuscitation.*, v.50, p.117–125, 2001.
- YONEYAMA, M.; KAWADA, K.; SHIBA, T.; et al. Endogenous nitric oxide generation linked to ryanodine receptors activates cyclic GMP / protein kinase G pathway for cell proliferation of neural stem/progenitor cells derived from embryonic hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.*, v.115, p.182–195, 2011.
- YOSHIDA, M.; SAKAI, T. Dantrolene, a calcium-induced calcium release inhibitor, prevents the acquisition of amygdaloid kindling in rats, a model of experimental epilepsy. *Tohoku J. Exp. Med.* v.209, n.4, p.303-310, 2006.
- ZHANG, W.; YAN, Q.; ZENG, Y. S.; et al. Implantation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells transfected with the neurotrophin-3 gene and pretreated with retinoic acid in completely transected spinal cord. *Brain Res.*, v.1359, p.256-271, 2010.
- ZENDEDEL, A.; NOBAKHT, M.; BAKHTIYARI, M.; et al. Stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) improves neural recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain Res.*, v.1473, p.214-226, 2012.
- ZHAO, F.; LI, P.; CHEN, S. R.; et al. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels molecular mechanisms and isoform selectivity. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.13810–13816, 2001.

ZHOU, L.; SHINE, H. D. Neurotrophic factors expressed in both cortex and spinal cord induce axonal plasticity after spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.*, v.74, n.2, p.221-226, 2003.