

Carla Maria Osório Silva

**CONDROITINASE ABC E CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NO
TRATAMENTO DE *Rattus norvegicus* SUBMETIDOS A TRAUMA AGUDO DA
MEDULA ESPINHAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal na área de Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Prof^a Eliane Gonçalves de Melo
Co-orientadores: Prof^a Dr^a Rogéria Serakides
Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2013

S586c Silva, Carla Maria Osório, 1977-
Condroitinase ABC e células tronco mesenquimais no tratamento de *Rattus norvegicus* submetidos a trauma agudo da medula espinhal / Carla Maria Osório Silva. – 2013.
80 p. : il.

Orientadora: Eliana Gonçalves de Melo

Co-orientadores: Rogéria Serakides, Alfredo Miranda de Goes

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. Células-tronco – Teses. 4. Medicamentos – Administração – Teses. I. Melo, Eliana Gonçalves de. II. Serakides, Rogéria. III. Goes, Alfredo Miranda de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.089 7

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARLA MARIA OSÓRIO SILVA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 08 de novembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:

Eliane Gonçalves de Melo

Prof^a. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador

Alexandre Mazzanti

Prof. Alexandre Mazzanti
Universidade Federal de Santa Maria

Vitor Márcio Ribeiro

Prof. Vitor Márcio Ribeiro
Universidade Católica de Minas Gerais - PUC

Natália de Melo Ocarino

Prof^a. Natália de Melo Ocarino
Escola de Veterinária - UFMG

Milene Alvarenga Rachid

Prof^a. Milene Alvarenga Rachid
Instituto de Ciência Biológicas - UFMG

Aos meus pais, José Carlos e Sônia

Ao Mikael, meu amor

Aos meus filhos, Caio e Davi, presentes da vida, que se tornaram instantaneamente a parte mais importante dela.

AGRADECIMENTOS

Ao Divino Espírito Santo que nos ilumina

Aos meus pais pelo amor, apoio e incentivo sempre! Por serem meus exemplos de vida e meu porto seguro e, também pelo tempo cuidando dos netos que permitiram que eu me dedicasse a esse trabalho mais tranquilamente.

Ao meu marido e filhos por completarem, alegrarem e encherem minha vida de amor, tornando tudo melhor.

À Professora Eliane por acreditar no meu potencial, obrigada pela confiança, paciência e valiosas orientações.

À Professora Rogéria pelas preciosas orientações, colaborações e ensinamentos.

Ao professor Alfredo, Juliana e toda equipe do laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB por me receberem tão bem e contribuírem tanto com o trabalho.

À amiga Karen pela amizade, apoio pessoal, profissional e grandiosa ajuda durante todo o doutorado.

Aos amigos Mário, Jankerle, Fátima, Fabíola, Tati, Juneo, Isabel e Endrigo pelo apoio, amizade e contribuição.

Aos colegas Pablo, Bernardo, Bruno e toda equipe de neurologia e, aos alunos de iniciação científica Guilherme, Laís e Anna pela ajuda na fase experimental.

Ao pessoal do laboratório de patologia especialmente o Juneo e a Leimar pela grandiosa ajuda.

Aos professores Milene Rachid, Alexandre Mazzanti, Natália Laporte e Vitor Márcio, que compuseram a banca de defesa, pela contribuição na finalização desse trabalho.

Ao professor Rubens pela contribuição durante a qualificação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário, da esterilização, da secretária de pós-graduação e da portaria do departamento pela convivência agradável, disponibilidade e colaboração.

Aos animais, especialmente Peçanha e Mendonça, pelo apoio emocional e também aos animais experimentais, que involuntariamente cederem a vida para realização desse estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina tri-fosfato

BBB – Escala de escores motores proposta por Basso, Beatie e Bresnahan

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

CETEA/UFMG – Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais

CD – *Cluster of differentiation*

cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

CDT – Condroitinase ABC

CDT+CTM – Condroitinase ABC mais células tronco mesenquimais

CN – Controle negativo

C_T – Ciclo limiar

CTM – Células tronco mesenquimais

DCCV – Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

eGFP – *Enhanced green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente melhorada)

EV – Escola de Veterinária

FACScan – *Fluorescence Activated Cell Analyser*

FC – *Fold change* (expressão gênica relativa)

GAG – Glicosaminoglicanos sulfatados

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial

GFP – *Green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

HE – Hematoxilina e eosina

HGF – Fator de crescimento do hepatócito

HLA-DR – Antígeno-DR leucocitário humano classe II

ICB – Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina

IV – Intravenosa

KDR – *Kinase insert domain receptor* (receptor do VEGF)
KW – Kruskal-Wallis
MAG – Glicoproteína associada à mielina
NGF – Fator de crescimento do nervo
NT-3 – Neurotrofina -3
OMgp – Glicoproteína oligodendrocito-mielina
PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PECAM-1 – Molécula de adesão celular endotélio plaquetária
PGSC – Proteoglicanos sulfato de condroitina
PLA – Grupo placebo
RNA – Ácido ribonucléico
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase transcriptase-reversa
SC – Subcutânea
SDF-1 – Fator 1 derivado de células estromais
S-N-K – Student-Newman-Keuls
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS	16
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. HIPÓTESE	21
2.1. Hipótese geral	21
2.2. Hipóteses particulares	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. REVISÃO DE LITERATURA	24
4.1. Fisiopatologia da lesão medular	24
4.2. O efeito inibitório da cicatriz glial e a enzima bacteriana condroitinase ABC	25
4.3. Ação das células tronco e das neurotrofinas na lesão medular	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1. Coleta da medula óssea, isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais da medula óssea transgênicas para proteína verde fluorescente	30
5.1.1. Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea transgênicas para proteína verde fluorescente por citometria de fluxo	31
5.2. Uso de condroitinase e células tronco mesenquimais da medula óssea, isoladas ou associadas	31
5.2.1. Animais	31
5.2.2. Grupos experimentais	32

5.2.3.	Protocolos anestésico e cirúrgico	32
5.2.4.	Injeção intramedular de condroitinase ABC ou líquido cefalorraquidiano artificial	33
5.2.5.	Injeção de células tronco mesenquimais da medula óssea ou PBS..	33
5.2.6.	Avaliação da capacidade motora	35
5.2.7.	Eutanásia	36
5.2.8.	Avaliação da expressão gênica relativa do BDNF, NT-3, VEGF, KDR, PECAM-1 e caspase 3 por RT-PCR em tempo real	37
5.2.9.	Avaliação anatomopatológica e imunoistoquímica	39
5.2.10.	Análise estatística	40
6.	RESULTADOS	41
6.1.	Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais da medula óssea transgênicas para proteína verde fluorescente	41
6.2.	Protocolos anestésico e cirúrgico	41
6.3.	Injeção intramedular de condroitinase ABC ou líquido cefalorraquidiano artificial	41
6.4.	Avaliação da capacidade motora	41
6.5.	Avaliação da expressão gênica relativa do BDNF, NT-3, VEGF, KDR, PECAM-1 e caspase 3 por RT-PCR em tempo real	43
7.	DISCUSSÃO	54
8.	CONCLUSÕES	66
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
10.	ANEXOS	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Genes com a respectiva sequência de nucleotídeos dos primers iniciadores para RT-PCR em tempo real	37
------------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema demonstrando a expansão da lesão primária frente à ocorrência dos eventos secundários que resulta na formação de cistos e cavidades exacerbando a disfunção neurológica (Adaptado de Taoka e Okajima, 1998)	25
Figura 2.	Genes com a respectiva sequência de nucleotídeos dos primers iniciadores para RT-P Fotografias a, b e c demonstram animal em procedimento cirúrgico de trauma medular experimental. a) Visualização, após laminectomia, da medula espinhal com aspecto normal (seta); b) Lesão compressiva da medula com peso de 70,5 g (seta); c) Visualização da medula com hemorragia após o trauma (seta). d) Infusão intramedular de condroitinase ou líquido cefalorraquidiano artificial, observa-se a micro bomba de infusão (estrela) conectada a uma seringa de Hamilton (seta)	34
Figura 3.	Linha de tempo demonstrando a localização temporal dos procedimentos: cirurgia de laminectomia com ou sem trauma (laminectomia ou trauma); injeção intramedular de condroitinase ou placebo (injeção CDT ou placebo); injeção de células tronco mesenquimais da medula óssea ou placebo (injeção CTM ou placebo); avaliação da capacidade motora pela escala de escores motores proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e eutanásia	36
Figura 4.	Gráfico com o perfil das medianas dos escores motores de ratos Lewis submetidos à laminectomia ou trauma medular espinhal e tratados com células tronco e/ou condroitinase, ou veículo, em cada um dos oito dias da avaliação após o procedimento cirúrgico. (CN=controle negativo,	

	PLA= placebo, CDT= condroitinase, CTM= células tronco mesenquimais e CDT+CTM= condroitinase e células tronco). Observa-se que na oitava avaliação, 28 dias após o trauma, o grupo CDT apresenta escores motores semelhantes ao CN, mas não se difere dos demais grupos. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$)	42
Figura 5.	Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de BDNF em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal associado ao tratamento com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * $p < 0,05$	43
Figura 6.	Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de NT-3 em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal associado ao tratamento com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). ($p < 0,05$)	44
Figura 7.	Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de VEGF em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal associado ao tratamento com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * $p < 0,05$	44
Figura 8.	Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) do receptor do VEGF, KDR (<i>kinase insert domain receptor</i>), em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal associado ao tratamento com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase mais células tronco mesenquimais	

	(CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * p<0,05	45
Figura 9.	Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de PECAM-1 em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal associado ao tratamento com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * p<0,05.	45
Figura 10.	Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de caspase 3 em ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal associado ao tratamento com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * p<0,05	46
Figura 11.	Fotomicrografias de secções transversais de cortes seriados da medula espinhal de um rato 30 dias após trauma medular agudo grave. Pode-se observar o agravamento da lesão nas regiões craniais (A a D) até o epicentro (E) e posterior retorno a normalidade tecidual nas secções caudais (F a I). A) Presença de área de mielomalácia focalmente extensa, limitada ao funículo dorsal, com perda de substância; B) e C) Área de necrose focalmente extensa intensa que se estende do funículo dorsal ao lateral da substância branca passando pela substância cinzenta, predominantemente em um dos lados. Distensão intensa do canal central; D) Mielomalácia difusa intensa com áreas de degeneração axonal na periferia da substância branca, predominantemente em um dos lados; E) Mielomalácia difusa F) Mielomalácia multifocal a coalescente intensa que se estende tanto na substância branca quanto na cinzenta; G) e H) Área focalmente extensa de mielomalácia de moderada a intensa no funículo dorsal e ventral associada a áreas de degeneração axonal multifocal moderada em toda substância branca; I) Área de mielomalácia	

	focalmente extensa limitada ao funículo dorsal. (Barra = 264 μ m). J) Gliócitos reativos; K) Células de Gitter. (Barra = 17 μ m).	48
Figura 12.	Média da intensidade integrada de pixels (\pm erro padrão médio) da marcação por imunistoquímica para anticorpo anti-neuN em ratos submetidos à laminectomia (CN) ou trauma medular agudo associado ao tratamento com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. * $p < 0,05$	49
Figura 13.	Média da intensidade integrada de pixels (\pm erro padrão médio) da marcação por imunistoquímica para anticorpo GFAP em ratos submetidos à laminectomia (CN) ou trauma medular agudo associado ao tratamento com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. * $p < 0,05$	50
Figura 14.	Média da intensidade integrada de pixels (\pm erro padrão médio) da marcação por imunistoquímica para anticorpo anti-vimentina em ratos submetidos à laminectomia (CN) ou trauma medular agudo associado ao tratamento com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. * $p < 0,0$	50
Figura 15.	Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos submetidos à imunistoquímica com anti-neuN trinta dias após a realização da laminectomia, com ou sem trauma medular. A) Controle negativo da bateria, secção que não recebeu o anticorpo; B) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo controle negativo (CN); C) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo placebo (PLA); D) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo condroitinase (CDT); E) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM); F) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo que recebeu a condroitinase e as células tronco	

	mesenquimais (CDT+CTM). Pode-se observar imunomarcção intensa nas secções pertencentes a animais dos grupos CN, CTM e CDT+CTM. (Barra = 44 µm).	51
Figura 16.	Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos submetidos à imunoistoquímica com anti-GFAP trinta dias após a realização da laminectomia, com ou sem trauma medular. A) Controle negativo da bateria, secção que não recebeu o anticorpo; B) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo controle negativo (CN); C) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo placebo (PLA); D) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo condroitinase (CDT); E) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM); F) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo que recebeu a condroitinase e as células tronco mesenquimais (CDT+CTM). As secções pertencentes aos animais do grupo PLA e CDT+CTM tiveram imunomarcção maior do que as do CN (Barra = 44 µm).	51
Figura 17.	Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos submetidos à imunoistoquímica com anti-vimentina trinta dias após a realização da laminectomia, com ou sem trauma medular. A) Controle negativo da bateria, secção que não recebeu o anticorpo; B) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo controle negativo, submetido à laminectomia sem trauma medular (CN); C) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo placebo (PLA); D) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo condroitinase (CDT); E) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM); F) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo que recebeu a condroitinase e as células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Pode-se observar que todas as secções pertencentes a animais submetidos a trauma medular apresentam imunomarcção mais intensa do que a secção pertencente ao CN e, que a secção do grupo PLA possui imunomarcção mais intensa do que a do grupo CDT (Barra = 44 µm). ..	52
Figura 18.	Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos submetidos à imunoistoquímica com anti-GFP 30 dias após a realização	

da laminectomia com trauma medular. A) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo placebo (PLA); B) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM). Pode-se observar imunomarcção somente na secção pertencentes ao animal do grupo CTM (Barra = 500 µm).	52
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Escala de escores para a capacidade motora de ratos proposta por Basso, Beatie e Bresnahan (1995)	20
------------------	--	----

RESUMO

A lesão da medula espinhal atinge pessoas e animais ocasionando déficits motores e sensoriais que comprometem consideravelmente a qualidade de vida e, no caso dos animais, muitas vezes, levam à eutanásia. O tratamento dessa afecção é um desafio para os pesquisadores, pois ainda não há terapia efetiva para essa complexa patologia. Nesse contexto, a utilização de células tronco surge como recurso terapêutico particularmente promissor, pois além de secretarem fatores neurotróficos, essas células podem se diferenciar em neurônios e componentes gliais, contudo essas ações parecem ser prejudicadas pela cicatriz glial formada após a lesão medular. A enzima bacteriana condroitinase ABC tem a capacidade de digerir essa cicatriz o que poderia favorecer a ação dessas células bem como a regeneração axonal. Com o objetivo de estudar o efeito da condroitinase ABC e das células tronco mesenquimais da medula óssea, em terapia única ou associada, no tratamento do trauma à medula espinhal foram utilizados 50 *Rattus norvegicus* divididos em cinco grupos. Os animais do grupo controle negativo (CN) foram submetidos à laminectomia, enquanto os demais sofreram adicionalmente trauma medular compressivo e foram tratados com placebo (PLA), condroitinase ABC (CDT), células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM) ou condroitinase e células tronco associadas (CDT+CTM). A CDT, ou PLA, foram administrados via intralésional, sete dias após a laminectomia; enquanto as CTM, ou PLA, foram injetados via intravenosa, 14 dias após a laminectomia. Os animais foram avaliados quanto à capacidade motora e, 30 dias após a laminectomia, procedeu-se a eutanásia e posterior verificação das alterações histopatológicas da medula espinhal. As medulas espinhais foram avaliadas também por meio da PCR, para quantificação da expressão gênica do BDNF, NT-3, VEGF, KDR, PECAM-1 e caspase 3; e da imunistoquímica, para detecção das células tronco injetadas (anti-GFP) e quantificação de astrócitos (anti-GFAP), neurônios (anti-NeuN) e vimentina. Não houve diferença estatística na capacidade motora dos animais submetidos ao trauma. Quanto à expressão gênica, o CTM foi superior na quantificação do BDNF e do VEGF e, não houve diferença entre os tratamentos quanto ao NT-3, KDR, PECAM-1 e caspase-3. Na avaliação imunistoquímica, as células tronco transgênicas foram detectadas nos grupos que a receberam. A marcação dos neurônios foi maior no grupo CDT+CTM em relação ao PLA. A imunomarcação para o GFAP foi maior nos grupos PLA e CDT+CTM do que no CN. Quanto à vimentina, a imunomarcação do CN foi menor e se diferiu de todos os grupos com trauma, sendo que entre esses, o CDT obteve a menor marcação. Concluiu-se que as células tronco mesenquimais foram eficientes para promover aumento na expressão dos fatores tróficos BDNF e VEGF ocasionando neuroproteção. A condroitinase ABC se mostrou efetiva na redução da cicatriz glial, verificada pela imunomarcação da vimentina. Não se observou sinergismo da associação CDT+CTM.

Palavras-chaves: trauma da medula espinhal, condroitinase, células tronco mesenquimais da medula óssea, ratos

ABSTRACT

The spinal cord injury affects people and animals causing sensory and motor deficits that greatly affect the quality of life and, in the case of animals, often lead to euthanasia. The treatment of this condition is a challenge for researchers because there is still no effective therapy for this complex pathology. In this context, the use of stem cells as a therapeutic resource appears particularly promising, because in addition to secrete neurotrophic factors, these cells can differentiate into neurons and glial components, however these actions appear to be harmed by the glial scar formed after spinal cord injury. The bacterial enzyme chondroitinase ABC is able to digest this scar which could favor the action of these cells as well as axonal regeneration. The present study aimed to evaluate the effect of chondroitinase ABC and bone marrow mesenchymal stem cells in single or combination therapy, in the treatment of rats subjected to spinal cord injury. Fifty *Rattus norvegicus* were divided into five groups. The animals in the negative control group (CN) underwent laminectomy, while the others suffered additionally spinal cord compression and were treated with placebo (PLA), chondroitinase ABC (CDT), bone marrow mesenchymal stem cells (CTM) or chondroitinase and stem cells associated (CDT + CTM). The chondroitinase or placebo were administered intralesionally, seven days after laminectomy, while the stem cells, or placebo, were injected intravenously 14 days after laminectomy. The animals were assessed for motor skills and, 30 days after laminectomy, proceeded to euthanasia and subsequent verification of histopathological changes in the spinal cord. The spinal cords were also evaluated by PCR for quantification of gene expression of BDNF, NT-3, VEGF, KDR, PECAM-1 and caspase 3; and by immunohistochemistry to detect the injected stem cells (anti-GFP) and quantification of astrocytes (anti-GFAP), neurons (anti-NeuN) and vimentin. There was no statistical difference in motor ability of animals subjected to trauma. The group CTM had the highest gene expression of BDNF and VEGF. There was no statistical difference between treatments for the gene expression of NT-3, KDR, PECAM -1 and caspase-3. In immunohistochemistry, labeling of neurons was higher in the CDT + CTM compared to PLA. Immunostaining for GFAP was higher in PLA and CDT+CTM than in CN. As for immunostaining of vimentin, the CN was lower and differed from all groups with trauma, and among these, CDT showed the lowest expression. It was concluded that the mesenchymal stem cells were effective in promoting increased expression of trophic factors BDNF and VEGF. The chondroitinase ABC was effective in reducing glial scar, verified by immunostaining of vimentin. There was no synergistic effect on use associated stem cells with chondroitinase.

Keywords: spinal cord injury, bone marrow mesenchymal stem cells, chondroitinase, rats

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que dois milhões e meio de pessoas convivam com lesão da medula espinhal e que mais de 130 mil novos casos ocorram por ano no mundo (Thuret et al., 2006; Hu et al., 2010). Essa afecção acomete cerca de 10.000 brasileiros anualmente, sendo a maioria constituída por jovens adultos, em plena fase produtiva (Campos et al., 2008). Em medicina veterinária de pequenos animais, embora não se conheça a incidência exata dessa patologia (Webb et al., 2010), ela é frequentemente encontrada (Tator e Fehlings, 1991; Bergman et al., 2000) e muitas vezes determina a morte ou eutanásia desses animais (Colter e Rucker, 1988).

O reparo do sistema nervoso central é muito limitado após uma lesão. O trauma leva a morte celular, particularmente de neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e precursores celulares. Qualquer cavidade ou cisto resultante dessas mortes pode interromper os tratos axonais (Ryu et al., 2009; Kundi et al., 2013) levando a várias anormalidades neurológicas, notadamente paresia e paralisia (Webb et al., 2010). Dessa forma, o trauma espinhal pode deixar sequelas debilitantes e permanentes com influências negativas sobre a qualidade e perspectiva de vida do paciente. O prognóstico ainda é desfavorável, pois as terapias disponíveis têm resultados limitados na recuperação neurológica. Sendo assim, essa afecção constitui problema desafiador para os pesquisadores (Brown e Hall, 1992; Thuret et al., 2006; Ng et al., 2011).

A utilização das células tronco nesse tipo de lesão surge como possibilidade de terapia particularmente promissora, pois além de se diferenciarem em neurônios e componentes da glia, repondo as células perdidas, elas

também atuam como ponte de apoio para a regeneração axonal (Dasari et al., 2007). As células tronco adultas podem se diferenciar em fenótipos neuronais apropriados em uma medula espinhal danificada (Boulenguez e Vinay, 2009; Ryu et al., 2009), entretanto, seu principal potencial não vem dessa propriedade, mas sim da capacidade de produção, ou estímulo à liberação endógena, de fatores tróficos (Chen et al., 2005; Lu et al., 2005; Sasaki et al., 2009). Dentre as células utilizadas, as mesenquimais têm sido estudadas intensivamente devido ao seu potencial para tratar doenças neurodegenerativas e injúrias traumáticas (Dasari et al., 2007). A utilização desse tipo celular, proveniente da medula óssea, é clinicamente atraente devido à facilidade de obtenção, expansão e reprodutibilidade, além da possibilidade de realização de transplante autólogo, minimizando o risco de rejeição (Wright et al., 2011).

Quando as células tronco são transplantadas para uma medula espinhal lesionada geralmente encontram ambiente desfavorável ao seu crescimento e à diferenciação devido a existência de uma barreira, a cicatriz glial (Karimi-Abdolrezaee et al., 2010). Essa cicatriz é resultante de processo multifatorial no qual ocorre proliferação e hipertrofia de astrócitos (Taoka e Okajima, 1998; Yiu e He, 2006; Hu et al., 2010) e, envolve ainda a participação de progenitores gliais, micróglia, macrófagos, fibroblastos e células de Schwann (Ryu et al., 2009).

Os proteoglicanos sulfato de condroitina (PGSC) estão entre os principais componentes desse tecido cicatricial e têm propriedades que impedem o crescimento axonal (Ikegami et al., 2005; Rolls et al.,

2008; Wright et al., 2011). Essa ação inibitória depende substancialmente das cadeias de glicosaminoglicanos presentes na molécula do PGSC (Iaci et al., 2007; Galtrey et al., 2008; Iseda et al., 2008). Com intuito de digerir essa cadeia de glicosaminoglicanos no PGSC e reduzir o efeito negativo no crescimento neural, tem sido testada a enzima bacteriana condroitinase ABC (CDT) na injúria medular (Iaci et al., 2007; Galtrey et al., 2008; Garcia-Alias et al., 2008; Iseda et al., 2008; Karimi-Abdolrezaee et al., 2010; Wright et al., 2011).

Para esse problema multifatorial que constitui a lesão medular, estudos envolvendo a combinação de terapias parecem mais promissores em conseguir abranger os diferentes aspectos patológicos e promover a completa reparação da medula lesionada (Lee et al., 2005; Boulenguez e Vinay, 2009; Ryu et al., 2009; Webb et al., 2010; McCreedy e Sakiyama-Elbert, 2012; Quertainmont et al., 2012; Zhao e Fawcett, 2013). A combinação de terapias incluindo a condroitinase têm demonstrado efeitos benéficos em lesões medulares (Massey et al., 2008; Huang et al., 2010; Karimi-Abdolrezaee et al., 2010; Lee et al., 2010; Garcia-Álias et al., 2011; Hwang et al., 2011), sendo esta enzima boa opção para esse tipo de abordagem por ter mecanismo de ação que não interfere com outros tratamentos (Zhao e Fawcett, 2013).

Neste contexto, a utilização de CTM da medula óssea em lesões da medula espinhal previamente tratadas com a CDT otimizaria os dois tratamentos. A CDT, além de reduzir os efeitos inibitórios da cicatriz glial, tornaria a matriz extracelular mais favorável à cinética das CTM e, estas, incrementariam a regeneração neuronal por meio da secreção de fatores neurotróficos, remielinização e/ou reconexão dos circuitos

neurais interrompidos (Ikegami et al., 2005; Karimi-Abdolrezaee et al., 2010). Essa enzima já foi testada com sucesso em associação com células progenitoras da mucosa olfatória adulta (Huang et al., 2010) e com células progenitoras neurais (Ikegami et al., 2005; Karimi-Abdolrezaee et al., 2010), mas não foram encontrados estudos associando a enzima às CTM da medula óssea.

2. HIPÓTESE

2.1. Hipótese geral

A CDT e as CTM da medula óssea agem de forma isolada e sinérgica no tratamento da lesão à medula espinhal, promovendo regeneração axonal e plasticidade neuronal, com conseqüente recuperação funcional.

2.2. Hipóteses particulares

1. A CDT digere a cadeia de glicosaminoglicanos na cicatriz glial e reduz seu efeito inibitório no crescimento axonal.

2. As CTM da medula óssea promovem regeneração neuronal e neuroproteção por meio da secreção de fatores tróficos e/ou reconexão dos circuitos neuronais interrompidos.

3. A utilização de CTM da medula óssea em lesões da medula espinhal previamente tratadas com CDT otimiza os dois tratamentos, pois a CDT promove ambiente mais favorável à cinética e à integração das CTM.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar o efeito da CDT e das CTM, em terapia única ou associada, no tratamento do trauma experimental à medula espinhal de ratos Lewis.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a capacidade motora de ratos Lewis após trauma experimental à medula espinhal e tratamento com CDT e CTM, em terapia única ou associada;

2. Avaliar as alterações anátomo patológicas da medula espinhal, após trauma experimental e terapia com CDT e CTM, com realização de cortes seriados e coloração com hematoxilina-eosina;

3. Quantificar por meio de avaliação imunohistoquímica os astrócitos (anti-GFAP), neurônios (anti-NeuN) e vimentina na medula espinhal após trauma experimental e terapia com CDT e CTM;

4. Avaliar a expressão gênica do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e seu receptor KDR, molécula de adesão endotélio plaquetária (PECAM-1) e caspase 3 na medula espinhal após trauma experimental e terapia com CDT e CTM.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Fisiopatologia da lesão medular

Quando a medula espinhal é submetida à ação traumática, dependendo da força inicial, ocorre rompimento de axônios e de vasos, por ação mecânica primária. A barreira hemato-espinhal fica comprometida levando a influxo de elementos vasculares, como células inflamatórias, para o parênquima espinhal (Ng et al., 2011). Essa lesão inicial desencadeia uma série de acontecimentos, os eventos secundários, causados por interrupção na perfusão vascular normal, mudanças eletrolíticas, e por uma cascata de mediadores da degeneração tecidual: produtos dos leucócitos, prostaglandinas, leucotrienos, radicais livres e excitotoxinas (Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990; Tator e Fehlings, 1991; Summers et al., 1995; Kornegay, 1998; Lu et al., 2000; Lee et al., 2005). A ocorrência de isquemia, o aumento de cálcio intracelular, a peroxidação de lipídios pelos radicais livres (Coughlan, 1993) e a apoptose desempenham papéis essenciais na ocorrência desses eventos secundários (Springer, 2002).

A isquemia progressiva pós-traumática desempenha função ímpar na patogênese do trauma medular agudo (Hedeman e Sil, 1974; Tator e Fehlings, 1991; Kornegay, 1998; Han et al., 2012). Além das alterações locais na vasculatura, como lesões diretas aos pequenos vasos e perda da autorregulação, esse tipo de trauma também causa mudanças circulatórias sistêmicas como hipotensão, diminuição do débito cardíaco e redução da perfusão tecidual (Tator e Fehlings, 1991; Taoka e Okajima, 1998; Ng et al., 2011). Essa perfusão tecidual deficiente resulta em hipóxia celular, com diminuição do

oxigênio e da glicose e conversão para o metabolismo anaeróbico. Vias anaeróbicas produzem quantidades deficientes de adenosina trifosfato (ATP) e ainda formam substâncias potencialmente lesivas como lactato, prostaglandinas e radicais livres de oxigênio (Janssens, 1991). O acúmulo de metabólitos do ácido láctico determina acidose e morte celular com liberação do conteúdo lisossomal composto de enzimas hidrolíticas que agravam o dano tecidual (Colter e Rucker, 1988). A depleção de ATP leva a falência das bombas da membrana que mantém a concentração iônica, levando ao acúmulo de sódio e cálcio dentro das células (Janssens, 1991; Jeffery e Blackmore, 1999).

O excesso de sódio resulta em edema celular e o cálcio ativa enzimas lesivas a proteínas e lipídios intracelulares levando ao rompimento de membranas celulares (Jeffery e Blackmore, 1999). Uma importante enzima ativada pelo excesso de cálcio intracelular é a fosfolipase A₂ que cliva o ácido araquidônico da membrana fosfolipídica iniciando uma resposta inflamatória em cascata (Hausmann, 2003; Talac et al., 2004; Grill, 2005; Kwon et al., 2005). Esse ácido é metabolizado através da via das cicloxigenases para formar prostaglandinas e pela via das lipoxigenases para originar os leucotrienos (Janssens, 1991; Coughlan, 1993). As prostaglandinas e os leucotrienos causam aumento da permeabilidade vascular resultando em extravasamento de plasma, edema tecidual e hemoconcentração. A partir do ácido araquidônico também é formado tromboxano que causa estase nos vasos e potencializa a agregação plaquetária (Colter e Rucker, 1988).

Paralelamente, ocorre quimiotaxia de leucócitos, principalmente neutrófilos, e macrófagos. Esse infiltrado inflamatório,

junto com a micróglia residente, liberam enzimas proteolíticas e oxidativas, e também citocinas pró-inflamatórias que acentuam o processo de morte celular no tecido que circunda o local original da lesão (Hausmann, 2003; Rowland et al., 2008). Em decorrência da destruição celular ocorre liberação de radicais livres que reagem com diversos componentes celulares causando peroxidação dos lipídios (Janssens, 1991). Os radicais livres atacam todos os componentes celulares, mas reagem principalmente com os ácidos graxos insaturados da membrana fosfolipídica (Coughlan, 1993). A peroxidação dessa camada causa desalinhamento dos lipídios, alterando a integridade da membrana, a fluidez e a manutenção dos gradientes iônicos (Brown e Hall, 1992). Os radicais livres também podem causar lesões diretas ao tecido neuronal e contribuir para as lesões isquêmicas através de danos à microvascularização (Janssens, 1991).

As lesões agudas são frequentemente acompanhadas por hemorragia, reação inflamatória e edema, que começam na substância cinzenta, e em algumas horas se expandem envolvendo a substância branca e os segmentos medulares adjacentes (Colter e Rucker, 1988; Braund et al., 1990). No primeiro momento, essa expansão ocorre por necrose das células

adjacentes, quase imediatamente após o trauma e, depois por um processo de morte mais tardio, caracterizado por apoptose neuronal, seguida por ativação microglial e apoptose de oligodendrócitos (Lu et al., 2000; Beattie, 2004). A ativação de proteases da família caspase é considerada como um processo chave para a apoptose e, tem sido relatada que a caspase 3 tem um papel crucial nesse tipo de morte celular desencadeada pela lesão da medula espinhal (Springer, 2002; Dasari et al., 2007).

A cascata de eventos secundários continua a ocorrer nas semanas que seguem a lesão medular, levando a formação de cistos e cavidades no centro da lesão que exacerbam a disfunção neurológica levando a perda de funções motora e/ou sensoriais (Colter e Rucker, 1988; Gril, 2005) (Fig. 1). O epicentro então se torna necrótico, macrófagos são recrutados para remover debris celulares e restos de mielina e, fibroblastos da meninge migram para a ferida (Kundi et al., 2013). As alterações patológicas que acompanham esses acontecimentos são caracterizadas por hemorragias, extravasamento de plasma, edema intracelular, necrose, cavitações, gliose e perda da arquitetura histológica (Hedeman e Sil, 1974; Tator e Fehlings, 1991).

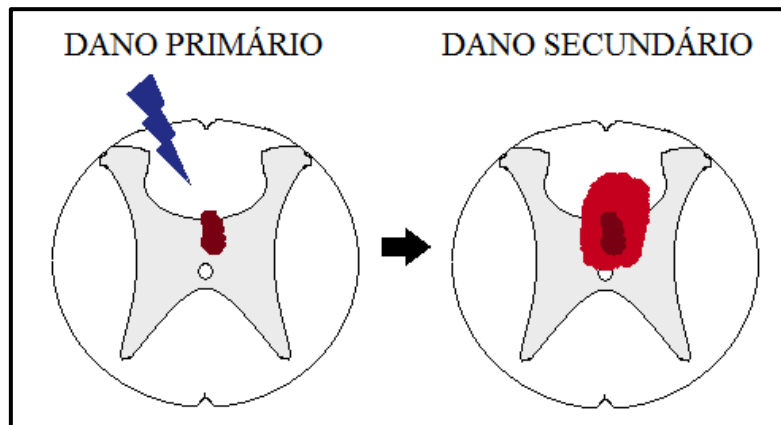


Figura 1. Esquema demonstrando a expansão da lesão primária frente à ocorrência dos eventos secundários que resulta na formação de cistos e cavidades exacerbando a disfunção neurológica (Adaptado de Taoka e Okajima, 1998).

O processo de reparação após a lesão medular é acompanhado de angiogênese (Xin-min et al., 2005; Mahoney et al., 2009; Ng et al., 2011), que auxilia na redução do dano secundário levando oxigênio e nutrientes para o sítio de regeneração e removendo os restos metabólicos. Dessa forma, a necrose que acompanha a lesão medular pode ser minimizada por esses novos vasos, que protegem o tecido nervoso da isquemia e melhoram a recuperação pós-lesão. Essa angiogênese é regulada por proteínas produzidas em resposta à privação de oxigênio, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento do fibroblasto e matriz metaloproteinases (Kundi et al., 2013).

O VEGF é um dos fatores angiogênicos mais importantes que atuam após a lesão medular. Ele tem funções múltiplas que incluem estímulo à mitose de células endoteliais e aumento de sua sobrevivência por vias antiapoptóticas, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (Patel et al., 2009), estímulo a morfogênese do vaso sanguíneo e regulação da função das células endoteliais (Kundi et al., 2013). Além disso, ele ainda tem ação neuroprotetora direta em neurônios da

medula espinhal de ratos, provavelmente mediada por seu receptor kinase (Xin-min et al., 2005), promovendo maior crescimento dos axônios após lesão medular (Jin et al., 2011).

Considerando as implicações da isquemia na fisiopatologia do trauma medular, entender o mecanismo pelo qual a revascularização ocorre e manipulá-lo pode ser ferramenta interessante para limitar o avanço dos danos secundários e obter neuroproteção (Ng et al., 2011; McCreedy e Sakiyama-Elbert, 2012). Dessa forma, estratégias terapêuticas que promovem a angiogênese costumam ser efetivas em reduzir o dano secundário, promover brotamento axonal e melhorar a recuperação funcional (Xin-min et al., 2005; Mahoney et al., 2009; Patel et al., 2009; Jin et al. 2011; Han et al., 2012; Kundi et al., 2013).

4.2. O efeito inibitório da cicatriz glial e a enzima bacteriana condroitinase ABC

Frente às injúrias ocorridas no trauma medular agudo, os astrócitos reagem com hipertrofia e aumento da expressão de filamentos intermediários, como a proteína

ácida fibrilar glial (GFAP) e a vimentina, é a chamada gliose reativa (Silver e Miler, 2004; Xia et al., 2008; Luna et al., 2010). A ativação e hipertrofia dessas células, associada à resposta inflamatória ao trauma, levam à formação da cicatriz glial (Hu et al., 2010). Os astrócitos reativos são o principal componente dessa cicatriz e atuam como uma barreira física e química à regeneração axonal. Eles produzem os PGSC (Silver e Miler, 2004; Tom e Houllé, 2008) considerados os principais responsáveis por prejudicar o brotamento axonal (Ikegami et al., 2005; Yiu e He, 2006; Iaci et al., 2007; Garcia-Alías et al., 2008; Rolls et al., 2008; Buffo et al., 2010).

Os PGSC consistem em um núcleo proteico ao qual muitas cadeias de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG) estão covalentemente ligadas (Tom et al., 2004; Crespo et al., 2007). Durante a fase de desenvolvimento do sistema nervoso central, essas moléculas formam barreiras que guiam o crescimento axonal (Ikegami et al., 2005; Iseda et al., 2008), coincidindo com o final do período crítico da plasticidade (Galtrey et al., 2008). Eles também estão presentes nas redes perineurais de mamíferos adultos, sendo os principais constituintes da matriz extracelular que circunda neurônios e células da glia. A presença dos PGSC ao redor das sinapses maduras parece limitar a plasticidade nesses locais (Yiu e He, 2006; Iaci et al., 2007; Garcia-Alías et al., 2008; Zhao e Fawcett, 2013). A expressão dessas moléculas é aumentada frente à ocorrência de danos no sistema nervoso central. Na injúria medular, a expressão de PGSC é máxima na segunda semana, com níveis progressivamente mais baixos até o 49º dia (Iseda et al., 2008).

Apesar do conhecido efeito inibitório na regeneração neuronal, os PGSC exercem

um papel dúbio, com crescente evidência de prover benefícios funcionais ao estabilizar o sistema nervoso central logo após a lesão (Silver e Miller, 2004; Jin et al. 2011; Sofreniew, 2012). Na fase aguda, após uma lesão, essas moléculas atuam na ativação da micróglia/macrófagos causando aumento na expressão de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e metaloproteinase da matriz e, diminuição dos níveis de fator de necrose tumoral alfa. Portanto, nessa fase, os PGSC têm papel benéfico, e possivelmente também atuam como uma barreira física, limitando a extensão das lesões. Entretanto, torna-se deletério na fase crônica, ou quando presente em quantidade excessiva (Crespo et al., 2007; Rolls et al., 2008), causando a falha em regenerar os axônios da medula espinhal e formar sinapses funcionais (Iaci et al., 2007; Buffo et al., 2010).

A cicatriz glial, além dos PGSC, contém outras moléculas inibitórias que incluem proteínas associadas à mielina, como a glicoproteína associada à mielina (MAG), Nogo-A, e glicoproteína oligodendrocyto-mielina (OMgp), expressas por oligodendrócitos (Sun e He, 2010; Wright et al., 2011; Kundi et al., 2013). A presença dessas moléculas está relacionada com a menor capacidade regenerativa dos axônios no sistema nervoso central (Silver e Miller, 2004; Iseda et al., 2008; Webb et al., 2010) que, somada ao acúmulo de compostos relacionados a degeneração e ao mau funcionamento da resposta imune (Colter e Rucker, 1988; Rolls et al., 2008), podem levar a uma paralisia permanente (Bradbury et al., 2002).

Quando os axônios danificados se confrontam com a natureza inibitória da cicatriz glial, conferida por moléculas como PGSC, eles se tornam distróficos (Tom et al., 2004) e, em alguns casos, apresentam-se

contorcidos nas proximidades da cicatriz como se estivessem desviando dela (Davies et al., 1997 citado por Tom et al., 2004). Hu et al. (2010) observaram que quatro semanas após a lesão medular, a demarcação entre a cicatriz glial e o tecido normal adjacente se torna claramente definida. Apenas poucos axônios conseguem penetrar a camada externa da cicatriz e, uma quantidade ainda menor na parte mais interna. Esses dados oferecem evidências diretas indicando o potencial regenerativo dos axônios e sua inibição pela cicatriz glial. Além disso, nota-se que a redução ou supressão dessa cicatriz pode ser uma estratégia terapêutica capaz de promover regeneração axonal (Iaci et al., 2007; Galtrey et al., 2008; Garcia-alias et al., 2008; Iseda et al., 2008; Wright et al., 2011).

A enzima bacteriana condroitinase ABC fragmenta as GAGs do núcleo protéico dos PGSC (Iaci et al., 2007; Garcia-alias et al., 2008; Iseda et al., 2008; Hyatt et al., 2010; Wright et al., 2011), as quais conferem a maioria de suas propriedades inibitórias (Tom et al., 2004; Crespo et al., 2007). A utilização dessa enzima tem demonstrado aumentar a regeneração e brotamento axonal (Garcia-alias et al., 2009; Tom et al., 2009; Lin et al., 2011), promover melhor desempenho funcional após lesão da medula espinhal (Bradbury et al., 2002; Ikegami et al., 2005; Huang et al., 2006; Hu et al., 2010; Karimi-Abdolrezaee et al., 2010) e aumentar a plasticidade sináptica (Massey et al., 2006; Tom e Houlé, 2008; Zhao e Fawcett, 2013). Além disso, a degradação dos PGSC pela condroitinase ABC resulta na formação do 6-sulfato dissacarídeo que possui potentes propriedades neuroprotetoras (Lin et al., 2011), sendo capaz de modular a micróglia e promover aumento dos níveis de IGF-1 e BDNF *in vivo* e *in vitro* promovendo

recuperação funcional. Esse dissacarídeo possivelmente contribui aumentando os efeitos benéficos dessa enzima (Rolls et al., 2008).

4.3. Ação das células tronco e das neurotrofinas na lesão medular

As células tronco adultas têm sido intensamente estudadas devido a sua potencial ação reparadora para tratar diversas doenças (Pittenger et al., 1999), como isquemias e injúrias traumáticas e neurodegenerativas (Syková e Jendelová, 2007; Vaquero e Zurita, 2011). O interesse por essas células também se justifica devido à ausência de implicações éticas à sua utilização, o que não ocorre com as células tronco embrionárias (Jiang et al., 2002; Kitada, 2012).

Uma das fontes mais promissoras de células tronco adultas é a medula óssea, que contém população heterogênea de células divididas em células tronco hematopoiéticas, células progenitoras hematopoiéticas e células tronco mesenquimais (CTM) (Syková e Jendelová, 2007; Kitada, 2012). As células tronco hematopoiéticas e mesenquimais podem se diferenciar, respectivamente, em células de linhagens hematopoiéticas e mesenquimais (Wright et al., 2011), embora essa última também possa se diferenciar *in vitro* em células com características da linhagem mesoderma visceral, neuroectoderma e endoderma (Jiang et al., 2002).

As CTM representam população de células indiferenciadas e de crescimento rápido. Da mesma maneira que ocorre com as células hematopoiéticas, um marcador molecular exclusivamente expresso por essas células ainda não foi identificado. Para resolver esse problema, a *International Society for Cellular Therapy* propôs três critérios para

definir essas células: aderência ao plástico, expressão específica de antígenos de superfície e potencial de diferenciação multipotente. Dessa forma, elas precisam aderir ao plástico quando mantida em condições de cultura padrão; 95% ou mais devem expressar CD105, CD73 e CD90, mensurado por citometria de fluxo, adicionalmente 2% ou menos devem expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e antígeno-DR leucocitário humano classe II (HLA-DR); e, além disso, devem ter a capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos sob condições de diferenciação padrão *in vitro* (Dominici et al., 2006; Vaquero e Zurita, 2011; Wright et al., 2011).

Para o transplante clínico, as CTM são bastante atrativas, pois são isoladas facilmente após aspiração da medula óssea, expandidas e reintroduzidas no paciente como enxerto autólogo (Vaquero e Zurita, 2011; Wright et al., 2011), eliminando a necessidade de imunossupressão (Paul et al., 2009; Kitada, 2012). Além disso, em caso de dano ou isquemia grave, elas são atraídas para o local da injúria, dispensando a necessidade de aplicação diretamente no local lesionado (Syková e Jendelová, 2007). Outra vantagem de sua utilização é a pequena expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade maior (classe II), implicando em baixa antigenicidade, uma grande vantagem para consideração no protocolo de terapia celular (Chen et al., 2005; Vaquero e Zurita, 2011). Essas células primeiramente despertaram a atenção como potenciais candidatas ao tratamento de doenças que afetam os tecidos mesodérmicos. Entretanto, tornou-se evidente que elas poderiam ser usadas para tratar afecções do sistema nervoso (Maltman et al., 2011), com base em pesquisas que comprovam recuperação

funcional em modelos animais de vários distúrbios neurológicos, como lesão medular, isquemia e trauma encefálico (Chen et al., 2001; Mahmood et al., 2005; Honma et al., 2006; Vaquero et al., 2006; Takeuchi et al., 2007; Osaka et al., 2010; Walker et al., 2010; Carvalho, 2011; Quertainmont et al., 2012; Nakajima et al., 2012).

O mecanismo preciso no qual as CTM transplantadas promovem recuperação funcional após uma lesão medular ainda não está esclarecido, mas várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar sua ação terapêutica (Osaka et al., 2010; Vaquero e Zurita, 2011). Em modelos animais, o transplante dessas células tem promovido neuroproteção (Honma et al., 2006; Rodrigues Hell et al., 2009), angiogênese (Syková e Jendlová, 2005), brotamento axonal (Hofstetter et al., 2002; Vaquero et al., 2006; Liu et al., 2007; Sasaki et al., 2009; Nakajima et al., 2012), remielinização (Akiyama et al., 2002), redução na apoptose (Caldeira, 2011), imunomodulação (Rodrigues Hell et al., 2009) e redução na cicatriz glial (Nakajima et al., 2012).

O principal mecanismo de ação dessas células relaciona-se com a influência exercida no meio ambiente da lesão medular devido à secreção de fatores solúveis e à promoção de matrix extracelular que fornece proteção e favorece o reparo axonal (Paul et al., 2009; Kitada, 2012; Quertainmont et al., 2012). As CTM sintetizam uma série de fatores neurotróficos, ou neurotrofinas, que estimulam o crescimento do nervo, entre elas o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a neurotrofina - 3 (NT-3), a neurotrofina-4 (NT-4) e o fator de crescimento do nervo (NGF). Essas

proteínas são fatores de crescimento que promovem o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência neuronal (Mahmood et al., 2005), características que fazem dessas células ferramenta terapêutica capaz de promover crescimento axonal e melhorar aspectos comportamentais após lesão medular (Webb et al., 2010).

Outra maneira pela qual essas células modificam o ambiente é por meio da imunomodulação (Uccelli et al., 2011; Kitada, 2012). Dessa forma, as CTM levam a redução da astrogliose e da ativação microglial, conseqüentemente há uma menor expressão de GFAP, o que pode contribuir para melhorar a sobrevivência neuronal e estabilidade sináptica (Rodrigues Hell et al., 2009). Adicionalmente, ocorre a liberação de moléculas anti-apoptóticas e citocinas anti-inflamatórias (Uccelli et al., 2011). Ao modificar a inflamação do ambiente, elas reduzem a formação da cicatriz glial e criam ambiente mais permissivo ao crescimento axonal e, com isso, contribuem para diminuir a formação de cavidades (Paul et al., 2009).

Portanto, após o transplante celular, pelo menos numa fase inicial, diferentes processos regenerativos, incluindo a liberação de fatores neurotróficos ou ativação de mecanismos endógenos, podem trabalhar juntos para restaurar funções neurológicas (Vaquero e Zurita, 2011; Quertainmont et al., 2012).

Outro mecanismo proposto para explicar o efeito terapêutico das CTM é a neurogênese. Embora controversa, a transdiferenciação de células da medula óssea em células neuronais parece ocorrer após o transplante celular em resposta a vários estímulos genéticos, químicos e/ou fisiológicos (Honma et al., 2006; Osaka et al., 2010; Uccelli et al., 2011). Três teorias

principais tentam explicar a neurogênese mediada pelas CTM: transdiferenciação, fusão celular e atividade parácrina por meio da liberação de fatores solúveis (Maltman et al., 2011). Na maioria das vezes, a caracterização fenotípica das células transdiferenciadas se limita a detecção de um marcador específico, sem constatação de nenhuma atividade específica, ou seja, não fica comprovado, por exemplo, que a CTM transdiferenciada em célula glial seja capaz de sintetizar mielina. Entretanto, alguns estudos comprovam essas particularidades, como o de Cho et al. (2005) que evidencia atividade eletrofisiológica, caracterizando função neuronal, nas CTM transplantadas. Um fato interessante é que quando se compara CTM induzidas e não induzidas, antes do transplante na medula espinhal lesionada, não ocorre diferença na regeneração axonal promovida pelos dois tipos de células. Além disso, a diferenciação glial ou neuronal antes do transplante dessas células não é necessária para promover remielinização, regeneração axonal e recuperação funcional (Wright et al., 2011).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi desenvolvido de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), aprovado sob protocolo de nº145/11 (Anexo 1).

Foram utilizadas as bases físicas e a infraestrutura do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV) da Escola de Veterinária (EV) e do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), ambos localizados na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sendo o trabalho desenvolvido principalmente nas seguintes estruturas:

- Biotério Experimental do Centro de Experimentação de Pequenos Animais do DCCV da EV/UFMG;
- Sala de Cirurgia Experimental de Pequenos Animais do DCCV da EV/UFMG;
- Laboratório de Patologia e Imunoistoquímica do Setor de Patologia Veterinária do DCCV da EV/UFMG;
- Núcleo de Célula Tronco e Terapia Celular do DCCV da EV/UFMG;
- Laboratório de Patologia Molecular do Setor de Patologia Veterinária do DCCV da EV/UFMG;
- Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB/UFMG.

5.1. Coleta da medula óssea, isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais da medula óssea transgênicas para proteína verde fluorescente

As CTM da medula óssea foram obtidas e cultivadas segundo protocolos já estabelecidos (Tropel et al., 2004; Boeloni et al., 2009; Caldeira, 2011).

Foram utilizados três *Rattus norvegicus* da linhagem Lewis, machos, com dois meses de idade, transgênicos para proteína verde fluorescente – GFP (LEW-Tg eGFP F455/Rrrc). Os animais foram provenientes do Biotério do ICB da UFMG, sendo suas matrizes oriundas da Universidade de Missouri nos Estados Unidos da América. As alterações genéticas desses animais foram caracterizadas pela presença do vetor lentivirus, contendo o gene eGFP sob o controle do promotor de ubiquitina C.

Os ratos receberam sobredose de tiopental sódico¹ (180 mg/kg), via intraperitoneal e, durante o período de latência da droga, foram submetidos à tricotomia dos membros posteriores. Em seguida, foi realizada punção cardíaca com retirada de sangue para diminuir a contaminação durante a coleta dos ossos. Após esse último procedimento, todos os animais sofreram parada cardíaca.

Após antissepsia, os fêmures e as tíbias dos animais foram coletados cirurgicamente, dissecados de tecidos musculares e conectivos adjacentes, e colocados em um tubo de 50 mL estéril contendo o meio DMEM² acrescido de gentamicina³ (60 mg), penicilina⁴ (10.000 un/mL), estreptomicina (1.000 µg/mL) e anfotericina⁵ (25 µg/mL).

Na sala de cultura celular, dentro do fluxo laminar, foram removidas as epífises proximal e distal de cada osso e, com o auxílio de uma seringa com o meio descrito acima, o canal medular foi limpo. O lavado

¹ Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

² Dulbecco's modified Eagle's médium, Gibco, Grand Island, NY, USA.

³ Ariston Indústrias e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Penicillin and streptomycin, Invitrogen, Life Technologies, USA.

⁵ Amphotericin, Invitrogen, Life Technologies, USA.

oriundo dos canais medulares foi coletado em tubo de 50 mL estéril, formando ao final um *pool* das medulas ósseas dos ratos. O tubo foi centrifugado a 1.400 rpm durante 10 minutos. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi suspenso novamente em 20 mL do meio descrito acrescido de 10% de soro fetal bovino⁶. As células foram cultivadas em garrafas T 75⁷, contendo 10 mL do meio acrescido do soro fetal bovino, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana e quando era observada 80 a 90% de confluência das células, elas eram suspensas utilizando a enzima tripsina⁸ e replicadas. Esse procedimento foi feito quatro vezes até o dia da inoculação celular nos animais.

5.1.1. Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea transgênicas para proteína verde fluorescente por citometria de fluxo

O fenótipo celular foi analisado por meio da expressão de moléculas de superfície (CD – *cluster of differentiation*). As células aderentes foram suspensas com a utilização de tripsina, centrifugadas por cinco minutos a 1200g e diluídas em PBS. Incubou-se alíquotas contendo 1 x 10⁶ células com os anticorpos monoclonais primários de camundongo⁹ anti-CD45 (clone 69), anti-CD73 (clone 5F/B9), anti-CD54 (clone 1A29) e anti-CD90 (clone 0X-7) por 30 minutos a 4°C. Após serem lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-camundongo Alexa 488 conjugado¹⁰ por mais 30 minutos a 4°C

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

⁷ TPP (Techno Plastic Products), Trasadingen, Switzerland

⁸ Trypsin 0,05%EDTA, Gibco, Grand Island, NY, USA.

⁹ BD Biosciences, San Jose, CA, EUA.

¹⁰ Invitrogen, Life Technologies, CA, USA.

C, as células foram fixadas em formalina 10%. Como controle negativo da reação, adicionou-se o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Realizou-se a leitura e as análises em citômetro de fluxo FACScan (*Fluorescence Activated Cell Analyser*)¹¹ com o emprego do software *Cell Quest*¹², com aquisição de 20.000 eventos. A expressão dos marcadores de superfície celular foi determinada pela comparação com o controle em gráfico de histograma e os dados foram analisados usando WinMDI 2.8 software análises (Castanheira et al., 2009).

5.2. Uso de condroitinase e células tronco mesenquimais da medula óssea, isoladas ou associadas

5.2.1. Animais

Foram utilizados 50 ratos adultos, linhagem Lewis, machos, com três meses de idade e peso médio de 321g, oriundos do Biotério da Universidade Estadual de Campinas.

Os ratos foram divididos, aleatoriamente, em cinco grupos de dez animais e colocados em caixas plásticas com quatro animais cada. Eles receberam ração comercial para roedores¹³ e água *ad libitum*, sendo submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas, em ambiente com temperatura controlada. Eles foram acomodados no Biotério do Centro de Experimentação de Pequenos Animais da EV-UFMG por pelo menos 14 dias antes do início do período experimental, para aclimação e

¹¹ FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA.

¹² The Cell Quest™ Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA.

¹³ Nuvilab CR-1®, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, Brasil

condicionamento à manipulação dos experimentadores.

5.2.2. Grupos experimentais

Grupo CN – Controle negativo (n=10): os animais foram submetidos à exposição da medula espinhal por meio de laminectomia. Após sete dias foi realizada reexposição medular e aos 14 dias aplicação intravenosa de PBS.

Grupo PLA – Tratamento com placebo (n=10): os animais foram submetidos à laminectomia seguida de trauma medular compressivo. Após sete dias foi realizada reexposição medular com aplicação intramedular de líquido cefalorraquidiano artificial e, aos 14 dias aplicação intravenosa de PBS.

Grupo CDT – Tratamento com condroitinase ABC (n=10): os animais foram submetidos à laminectomia seguida de trauma medular compressivo. Após sete dias foi realizada reexposição medular com aplicação intramedular de condroitinase ABC e aos 14 dias aplicação intravenosa de PBS.

Grupo CTM – Tratamento com células tronco mesenquimais (n=10): os animais foram submetidos à laminectomia seguida de trauma medular compressivo. Após sete dias foi realizada reexposição medular com aplicação intramedular de líquido cefalorraquidiano artificial e aos 14 dias aplicação intravenosa de CTM.

Grupo CDT+CTM – Tratamento com condroitinase ABC e células tronco mesenquimais (n=10): os animais foram submetidos à laminectomia seguida de trauma medular compressivo. Após sete dias foi realizada reexposição medular com

aplicação intramedular de condroitinase e aos 14 dias aplicação intravenosa de CTM.

5.2.3. Protocolos anestésico e cirúrgico

Os animais receberam indução e manutenção anestésicas com isoflurano¹⁴, fornecido por meio de máscara facial em sistema semiaberto. Com os animais anestesiados, foi realizada a tricotomia da região dorsal, antibiótico profilático com cefalotina sódica¹⁵ (60 mg/kg, IV) e medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol¹⁶ (4 mg/kg, SC).

Os ratos foram então posicionados em decúbito esternal em uma plataforma de polietileno com aquecimento, sendo que nos animais dos grupos com trauma essa plataforma era conectada ao aparelho estereotáxico desenvolvido na EV da UFMG (Torres et al., 2010). A incisão de pele e tecido subcutâneo foi realizada na linha média dorsal estendendo-se de T10 a L1. Os músculos epiaxiais foram afastados lateralmente após a incisão de suas inserções nos processos espinhosos de T11 a T13. Com auxílio de uma pinça de *Kocher* realizou-se ostectomia do processo espinhoso de T12, e empregando-se *drill* pneumático neurológico¹⁷ retirou-se a lâmina dorsal da vértebra (laminectomia). A broca do *drill* foi irrigada com solução fisiológica¹⁸ para evitar o aquecimento do tecido.

¹⁴ Isoflurane, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil.

¹⁵ Cefalotina, Ariston Indústrias e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁶ Tramadol, Laboratórios Pfizer, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁷ ECCOS® Aesculap, Laboratório B. Braun, São Gonçalo-RJ, Brasil.

¹⁸ Cloreto de sódio a 0,9%, solução eletrolítica injetável, Laboratório Sanobiol Ltda, Brasil

Após a visualização da medula espinhal (Fig. 2a), a haste metálica do aparelho estereotáxico foi colocada em contato com a dura-máter e solta suavemente permanecendo cinco minutos exercendo pressão de 70,5 g sobre a medula (Fig. 2b), provocando assim trauma compressivo (Fig. 2c) de acordo com modelo pré-estabelecido (Torres et al., 2010). Esse procedimento não foi realizado nos animais pertencentes ao grupo CN, que sofreram apenas laminectomia, sem trauma. Em seguida, foi realizada a aproximação dos músculos seccionados com sutura padrão *Reverdin* e redução do espaço morto com sutura simples contínua, ambas empregando-se fio polipropileno 4-0¹⁹. A dermorrafia foi realizada com o fio mononylon 4-0²⁰ e pontos simples separados.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas aquecidas até completa recuperação anestésica. Eles receberam analgesia com cloridrato de tramadol (2 mg/kg, SC) e antibioticoterapia com cefalexina sódica (30 mg/kg), ambos a cada 12 horas, por via oral, durante cinco dias. Os animais foram examinados a cada 12 horas e receberam massagem vesical para esvaziamento da bexiga durante sete dias, quando todos os animais já apresentavam completo retorno da função vesical. Os pontos de pele foram removidos no sétimo dia após a cirurgia.

5.2.4. Injeção intramedular de condroitinase ABC ou líquido cefalorraquidiano artificial

Após uma semana da intervenção cirúrgica (Fig. 3), os ratos foram submetidos à

reexposição da medula espinhal, adotando-se os mesmos protocolos anestésico e cirúrgico descritos anteriormente. Em seguida à identificação da área submetida à laminectomia e com auxílio de uma micro bomba de infusão conectada a uma seringa de Hamilton²¹, foram infundidos no epicentro da lesão 4 µL de condroitinase ABC (0,55 u/µL) nos animais dos grupos CDT e CDT+CTM; ou, 4 µL de líquido cefalorraquidiano artificial nos animais do grupo PLA e CTM, ambos à velocidade de 0,8 µL/min (Fig. 2d). Após o término da aplicação, a agulha permaneceu no local por mais um minuto para evitar o extravasamento do líquido. Terminado esse procedimento, foram realizadas a aproximação dos músculos seccionados, a redução do espaço morto, a dermorrafia e os procedimentos pós-operatórios seguindo-se o protocolo descrito no item anterior.

5.2.5. Injeção de células tronco mesenquimais da medula óssea ou PBS

Imediatamente antes da inoculação nos animais, as células foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de tripan. Após suspensão com tripsina e adição de DMEM com 10% de soro fetal bovino, as células foram colhidas, centrifugadas e, o *pellet* contendo as células suspenso novamente em 2 mL de DMEM. Retirou-se 2 µL dessa suspensão e adicionou-se a 49 µL de PBS e 49 µL de azul de tripan e, na câmara de Neubauer foi determinado o número total de células e o número de células viáveis. Esse número de células viáveis foi utilizado para determinar o volume de tampão fosfato salino (PBS) estéril a ser adicionado ao *pellet* de células para uma concentração final de 5×10^6 células/mL, utilizada para o transplante

¹⁹ Prolene®, Polypropylene suture, Ethicon Incorporations, São Paulo, SP, Brasil.

²⁰ Fio inabsorvível sintético, Johnson & Johnson, Brasil.

²¹ Seringa 1701 RN-HP 10µL SYR, Hamilton Company, Reno, NV, USA.

celular. Antes de serem colocadas nessa concentração final, as células foram lavadas três vezes com PBS para retirada de resquícios de soro fetal bovino que poderia causar reação de rejeição nos animais.

A injeção das células ou do PBS foi realizada após duas semanas da primeira intervenção cirúrgica (Fig. 3). Para esse procedimento, os ratos foram contidos

manualmente e receberam uma injeção de 0,2 mL na veia caudal. Os animais dos grupos CN, PLA e CDT receberam PBS e, os dos grupos CTM e CDT+CTM receberam o mesmo volume de PBS contendo cerca de 1×10^6 de CTM.

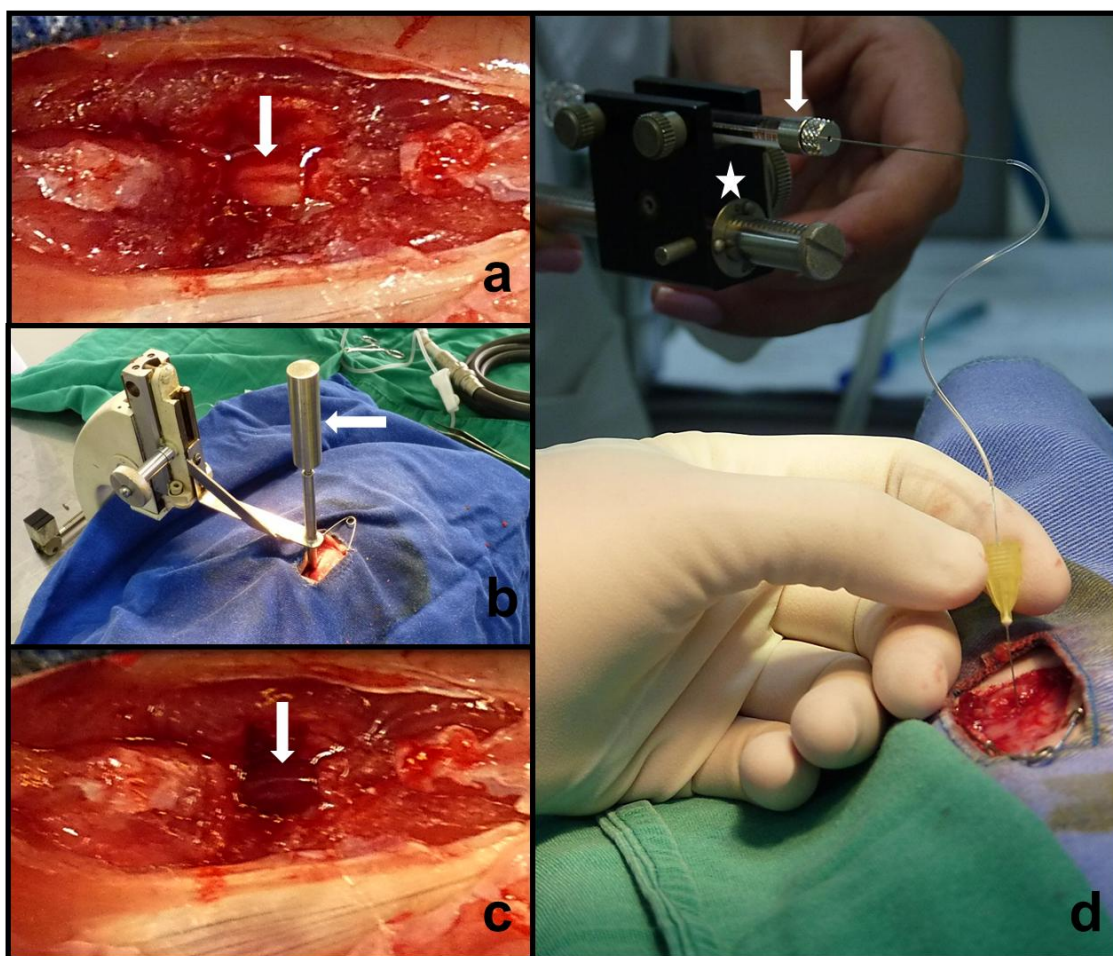


Figura 2. Fotografias a, b e c demonstram animal em procedimento cirúrgico de trauma medular experimental. a) Visualização, após laminectomia, da medula espinhal com aspecto normal (seta); b) Lesão compressiva da medula com peso de 70,5 g (seta); c) Visualização da medula com hemorragia após o trauma (seta). d) Infusão intramedular de condroitinase ou líquido cefalorraquidiano artificial, observa-se a micro bomba de infusão (estrela) conectada a uma seringa de Hamilton (seta).

5.2.6. Avaliação da capacidade motora

A avaliação da capacidade motora foi realizada em todos os animais 24 horas antes e após a primeira cirurgia, bem como a cada quatro dias até dois dias antes da eutanásia (Fig. 3). Antes do início das avaliações, os animais foram colocados no campo plano por duas vezes, com o intuito acostamá-los ao ambiente do teste. A avaliação realizada 24 horas após o primeiro procedimento cirúrgico foi intitulada avaliação 1, por ser a primeira após a submissão dos animais a

procedimento experimental potencialmente lesivo. Foi utilizada a escala de escores motores proposta por Basso, Beatie e Bresnahan (BBB) (Basso et al., 1995) (Quadro 1). Os animais foram colocados em campo plano de 1m² e filmados durante dois minutos. Os filmes foram posteriormente assistidos por dois avaliadores indiferentes aos grupos dos animais. Eles classificaram o padrão locomotor e atribuíram escores de zero a 21 de acordo com a escala proposta.

Quadro 1. Escala de escores para a capacidade motora de ratos proposta por Basso, Beatie e Bresnahan (1995).

Escore	Capacidade Motora
0	Nenhum movimento observável nos membros posteriores
1	Movimento discreto de uma ou duas articulações, normalmente o quadril (coxofemoral) ou joelho (femerotibiopatelar)
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 do membro posterior
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 do membro posterior
8	Andar tocando no chão mas sem apoio do peso ou Posição plantar do membro sem apoio do peso
9	Posição plantar do membro com apoio do peso quando parado ou Apoio de peso ocasional, frequente ou consistente na passada dorsal e sem passada plantar
10	Suporte de peso ocasional na passada plantar, sem coordenação dos membros torácicos e pélvicos
11	Apoio do peso frequente a consistente na passada plantar sem coordenação dos membros torácicos com os pélvicos
12	Apoio do peso frequente a consistente na passada plantar com ocasional coordenação dos membros torácicos e pélvicos
13	Apoio do peso frequente a consistente na passada plantar com frequente coordenação dos membros torácicos e pélvicos
14	Consistente apoio de peso na passada plantar, consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos, e a posição predominante do membro quando em locomoção é rotacionado (externa ou internamente) quando faz contato inicial com a superfície, bem como imediatamente antes de ser levantado no final da postura; ou Passada frequentemente plantar com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos e passadas dorsais ocasionais
15	Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos, sem levantar dos dedos dos pés; ou ocasional levantar dos dedos do pé ao avançar do membro, a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial
16	Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante

	a marcha, e o levantar dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante o avançar do membro para frente; a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial e rotacionada ao final do movimento
17	Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante a marcha, e o levantar dos dedos dos pés ocorre frequentemente durante o avançar do membro para frente; a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial e final do movimento
18	Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante a marcha, o levantar dos dedos dos pés ocorre consistentemente durante o avançar do membro para frente; a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial e rotacionada ao final do movimento
19	Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante a marcha, o levantar dos dedos dos pés ocorre consistentemente durante o avançar do membro para frente; a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial e ao final do movimento; e a cauda está abaixada em parte ou todo o tempo
20	Passada plantar e marcha coordenada consistentes, levantar dos dedos dos pés consistente, posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial e ao final do movimento; cauda consistentemente para cima e instabilidade do tronco
21	Passada plantar e marcha coordenada consistentes, levantar dos dedos dos pés consistente, a posição predominante do membro é paralela o movimento todo, consistente estabilidade do tronco, cauda constantemente levantada

5.2.7. Eutanásia

Trinta dias após o trauma ou laminectomia (Fig. 3), todos os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico (180 mg/kg), por via intraperitoneal, seguida de punção cardíaca com retirada de sangue. De cada grupo experimental

composto por dez animais, seis foram destinados à avaliação anatomopatológica e imunoistoquímica e quatro foram destinados à avaliação da expressão gênica por meio da reação em cadeia da polimerase.

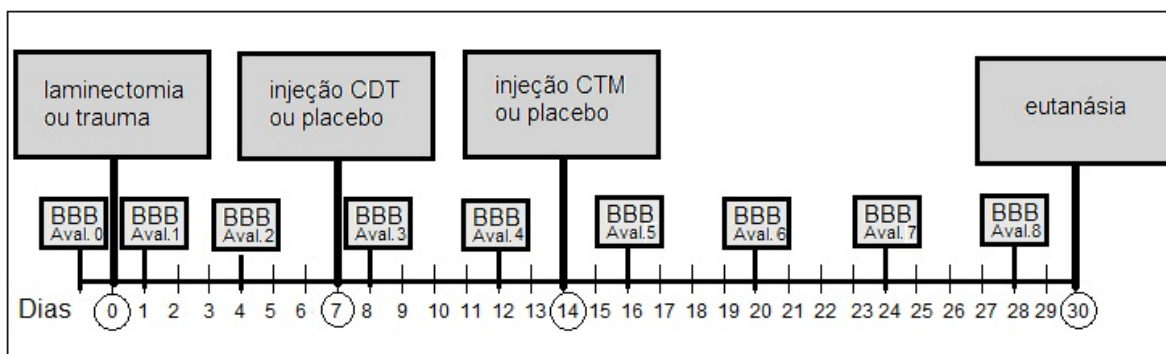


Figura 3. Linha de tempo demonstrando a localização temporal dos procedimentos: avaliação da capacidade motora pela escala de escores motores proposta por Basso, Beatie e Bresnahan (BBB) desde a avaliação zero (Aval. 0), realizada antes do procedimento cirúrgico, até a última (Aval. 8); cirurgia de laminectomia com ou sem trauma (laminectomia ou trauma); injeção intramedular de condroitinase ou placebo (injeção CDT ou placebo); injeção de células tronco mesenquimais da medula óssea ou placebo (injeção CTM ou placebo) e eutanásia.

5.2.8. Avaliação da expressão gênica relativa do BDNF, NT-3, VEGF, KDR, PECAM-1 e caspase 3 por RT-PCR em tempo real

Quatro animais de cada grupo foram submetidos à técnica de reação em cadeia da polimerase transcriptase-reversa (RT-PCR) em tempo real para avaliação da expressão gênica do fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF), da neurotrofina 3 (NT-3), do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e do seu receptor KDR (*kinase insert domain receptor*), da molécula de adesão celular endotélio plaquetária (PECAM-1) e do fator de apoptose caspase 3.

Imediatamente após a eutanásia, um segmento de 1,5 cm da medula espinhal, contendo o epicentro da lesão em sua região central, foi retirado assepticamente. Ele foi dividido em três segmentos menores de 0,5 cm cada, e colocado em criotubos identificados como cranial, epicentro ou caudal. Os criotubos foram congelados prontamente em nitrogênio líquido e, em seguida, transferidos para um freezer à temperatura de -80°C.

Para avaliação da expressão dos genes descritos acima, e do gene normalizador da beta-actina, foram utilizados os segmentos medulares identificados como epicentros e os primers iniciadores *Forward* (F) e *Reverse* (R) indicados na tabela 1 (Tab.1).

Tabela 1. Genes com a respectiva sequência de nucleotídeos dos primers iniciadores para RT-PCR em tempo real

Gene	Sequência de nucleotídeos	Nº acesso
BDNF	F: CCACAATGTTCCACCAGGTG R: TGGGCGCAGCCTTCAT	NM_012513.3
Neurotrofina-3	F: TGTGACAGTGAGAGCCTGTGG R: TGTAACCTGGTGTCCCCGAA	NM_031073.2
VEGF	F: GCCCAGACGGGGTGGAGAGT R: AGGGTTGGCCAGGCTGGGAA	NM_001110336.1
KDR	F: GTCCGCCGACACTGCTGCAA R: CTCGCGCTGGCACAGATGCT	NM_013062.1
Caspase 3	F: TGGAGGAGGCTGACCGGCAA R: CTCTGTACCTCGGCAGGCCTGAAT	NM_012922.2
PECAM-1	F: GAAGGTTTCTGAGCCCAGTG R: TCAAGGGAGGACACTTCCAC	NM_031591.1
Beta-actina	F: GCGTCCACCCGCGAGTACAA R: ACATGCCCGAGCCGTTGTCG	NM_031144.2

O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol²² de acordo com as instruções do fabricante. Cada segmento com o epicentro da medula foi transferido para um tubo cônico, adicionou-se 1 mL de trizol, e em seguida ele foi macerado com pistilo de plástico estéril livre de RNase e DNase. Após cinco minutos no gelo, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio em cada tubo que foi agitado manualmente por 15 segundos e colocado no gelo por mais dois minutos. As amostras foram centrifugadas a 11400 rpm durante 15 minutos e, então, observou-se a formação de três fases distintas. A superior, transparente, contendo o RNA foi transferida cuidadosamente para um tubo cônico novo ao qual foi adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico para precipitação do RNA. Após congelamento das amostras a -80°C durante 30 minutos, elas foram descongeladas e centrifugadas a 11400 rpm e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, centrifugado mais uma vez a 11400 rpm e 4°C por 10 minutos, sendo então descartado. Os tubos contendo os *pellets* com o RNA, proveniente das duas centrifugações receberam 1,0 mL de etanol 75% cada, sendo novamente centrifugados, o etanol descartado e os tubos colocados para secar. Após a secagem, o RNA foi homogeneizado adicionando-se 20 µL de água ultrapura²³ seguido de incubação por 10 minutos a 55°C. Desse RNA foi retirada uma amostra para quantificação e o restante foi congelado a -80°C para posterior confecção do DNA complementar (cDNA).

Para quantificação do RNA, 2,0 µL de cada amostra foi adicionado a 98 µL de água ultrapura. A mensuração foi realizada em espectrofotômetro de luz UV por meio da

avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias 260/280 nm.

A confecção do cDNA foi realizada com a utilização de *kit* comercial²⁴ de acordo com as instruções do fabricante. Os reagentes foram estimados para utilização com 1,0 µg de RNA, que foi calculado pelo grau de pureza da amostra. Foi feito um *mix* para cada amostra com o 2xRT e o RT (transcriptase reversa) contidos no kit. Os tubos contendo o *mix*, água ultrapura e RNA foram colocados no termociclador a 25°C durante 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 85°C durante 5 minutos. Após a adição de 1,0 µL de RNase H, as amostras foram incubadas no termociclador a 37°C durante 20 minutos, e congeladas a -20°C para posterior realização do PCR em tempo real.

A PCR em tempo real foi realizada com a utilização dos reagentes SYBR green e Rox do *kit* comercial acima, além dos *primers* iniciadores *forward* e *reverse*, e do cDNA sintetizado. As reações de amplificação do cDNA dos genes foram realizadas na plataforma de instrumentação *ABI Prism 7900*, adotando-se 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação da fita dupla, um minuto a 60°C para anelamento dos iniciadores dos respectivos genes, um minuto a 75°C para extensão dos amplicons e mais 10 minutos a 75°C para término da reação. O *Software 7500 v.2.0.1 Applied Biosystems* apresentou os resultados em gráfico de fluorescência em relação ao número de ciclos, sendo o ciclo limiar, ou *threshold* (C_T), o ciclo em que foi detectada fluorescência acima do limite basal estabelecido.

²² Invitrogen, Life Technologies, CA, USA.

²³ Ultra-pure®DEPC-treated water, Gibco, Invitrogen, CA, USA.

²⁴ SuperScript III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR® Green Invitrogen, CA, USA.

A expressão gênica relativa ou *fold change* (FC) de cada gene foi calculada utilizando-se o método do $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Assim, o delta C_T (ΔC_T) foi determinado pela subtração do C_T do gene pesquisado pelo C_T do gene normalizador beta actina. O delta delta C_T ($\Delta\Delta C_T$) foi encontrado pela diferença entre o ΔC_T e a média do ΔC_T do grupo controle. E a expressão gênica relativa foi dada pela fórmula: $FC = 2^{-\Delta\Delta C_T}$. (Livak e Schmittgen, 2001; Yuan et al., 2006).

5.2.9. Avaliação anatomopatológica e imunoistoquímica

Seis animais de cada grupo, imediatamente após a eutanásia, foram submetidos à perfusão transcardíaca em bomba de infusão com 250mL de PBS (0,15M, pH=7,4) seguida de 250mL de solução fixadora formol 10% tamponado, ambos a uma velocidade de 450mL/h. Em seguida, o local do trauma foi inspecionado para verificação de aderência, seroma ou hematoma e a medula espinhal foi removida e colocada em formol 10% tamponado. Após a remoção da medula espinhal, os animais foram submetidos à necropsia para verificação de alterações macroscópicas. Um segmento de 2,7cm de cada medula espinhal, contendo o epicentro da lesão em sua região central, foi processado pela técnica de rotina para inclusão em parafina. Antes de ser inserido no bloco de parafina, cada segmento foi dividido em três partes iguais que foram identificadas como cranial, epicentro ou caudal.

Os animais foram submetidos a cortes seriados dos três segmentos para caracterização da lesão. A realização desses cortes iniciou-se com a retirada de 20 cortes de quatro micrômetros cada, colocados em quatro lâminas previamente gelatinizadas, cinco cortes por lâmina. Em seguida, 380µm foram desbastados e mais vinte

secções foram cortadas e colocadas em quatro lâminas, assim sucessivamente, até o final da área lesionada. A primeira lâmina de cada série de 20 foi corada com hematoxilina e eosina e utilizada para avaliação histológica em microscopia óptica e análise das possíveis alterações.

Para a avaliação imunoistoquímica, selecionou-se para cada anticorpo, uma lâmina por animal contendo área de necrose focalmente extensa moderada no corno dorsal, localizada na região caudal adjacente ao epicentro da lesão. As lâminas foram colocadas em xilol para retirada da parafina, hidratadas em concentrações decrescentes de álcool e colocadas em solução de peróxido de metanol 0,3% durante 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagem em PBS, as secções foram incubadas por 30 minutos com solução bloqueio, e depois incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários. Cortes controles, com omissão do anticorpo primário, foram feitos em todas as reações para verificar a especificidade da marcação. No dia seguinte foi realizada a ligação com anticorpo secundário, bloqueio da biotina com estreptovidina-peroxidase, revelação da reação com 3-3'-diaminobenzidina²⁵ e, contra coloração com hematoxilina.

Foram utilizados os anticorpos primários para marcação dos componentes dos filamentos intermediários dos astrócitos: vimentina²⁶ (1:200) e GFAP²⁷ (1:200), permitindo uma avaliação da cicatriz glial; e anti-NeuN²⁸ (1:500) para uma avaliação indireta da ação das células tronco pela

²⁵ DAB, Dako, Carpinteria, CA, USA.

²⁶ V9, Dako, Carpintería, CA, USA.

²⁷ Anti-GFAP, Invitrogen, Life Technologies, USA.

²⁸ Anti-neuN - Chemicon Internacional Inc., Temecula, CA, USA.

detecção de neurônios íntegros. As lâminas marcadas por esses anticorpos foram fotografadas e analisadas pelo software de análise de imagem ImageJ®²⁹, sendo que, para cada imagem, quantificou-se a média da densidade integrada de pixels das células subtraída do *background*. Utilizou-se ainda o anticorpo anti-GFP³⁰ (1:1500) para análise qualitativa da presença das células tronco transgênicas na medula espinhal lesionada dos animais receptores.

5.2.10. Análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Verificou-se a normalidade dos parâmetros pelo teste Kolmogorov-Smirnov e as variâncias foram comparadas pelo teste F. Os dados referentes às expressões gênicas e imunomarcações foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Student-Newman-Keuls (S-N-K) para comparação das médias. Os escores da avaliação da capacidade motora foram submetidos ao procedimento não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW), seguido de comparações múltiplas entre pares de tratamentos pelo teste de Dunn. As análises foram realizadas com o auxílio do *Prism 5 for Windows, version 5.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA*. O nível de significância adotado foi de 5%.

²⁹ National Institutes of Health, USA.

³⁰ Anti-GFP ab 290 – Abcam, UK.

6. RESULTADOS

6.1. Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais da medula óssea transgênicas para proteína verde fluorescente

As células cultivadas apresentaram características morfológicas típicas de células tronco mesenquimais, com formato fusiforme semelhante ao fibroblasto, aderência ao plástico e alta taxa de proliferação. Durante a fase de divisão celular e/ou quando eram submetidas à ação da tripsina, essas células tornavam-se esféricas, mas ao aderirem à garrafa de cultura, tornavam-se espiculadas e rapidamente se fundiam em uma monocamada (Maltman et al., 2011).

Após a terceira passagem, as células foram caracterizadas fenotipicamente por citometria de fluxo utilizando os anticorpos CD90, CD73, CD54 e CD45. A população examinada expressou CD90, CD73 e CD54, considerados marcadores fenotípicos de células tronco mesenquimais, nas porcentagens respectivas de 86,77%, 93,99% e 95,10%. Além disso, 96,94% das células não expressaram CD45, que é característico de precursor hematopoiético (Castanheira et al., 2009).

6.2. Protocolos anestésico e cirúrgico

Após as cirurgias, de trauma medular ou aplicação intramedular, nenhum animal apresentou alteração de comportamento ou de apetite condizente com dor. Também não foi observado nenhum sinal compatível com infecção da ferida cirúrgica ou reação ao fio empregado. No momento da retirada dos pontos, sete dias após a cirurgia, todos os animais apresentaram ferida completamente fechada e sem secreção.

Dos 40 animais submetidos ao trauma medular, 26 (65%) apresentaram retenção urinária e/ou hematuria, sendo que 20 (50%) manifestaram ambos os sintomas, cinco (12,5%) apenas retenção e um (2,5%) rato teve somente hematuria. A duração média desses sintomas foi de três dias para hematuria e cinco dias para retenção. Os animais submetidos apenas à laminectomia não apresentaram qualquer alteração vesical ou comportamental.

6.3. Injeção intramedular de condroitinase ABC ou líquido cefalorraquidiano artificial

A administração intramedular de condroitinase ou líquido cefalorraquidiano artificial (placebo), sete dias após o trauma medular, foi de realização simples e rápida. No momento do acesso cirúrgico, a ferida anterior estava cicatrizada, e a ausência do processo espinhoso de T12 facilitou a localização do epicentro da lesão medular. Os animais tiveram ótima recuperação após essa intervenção e, não apresentaram aumento dos déficits motores ou alterações comportamentais e vesicais.

6.4. Avaliação da capacidade motora

A avaliação da capacidade motora pela escala de escores BBB foi de realização simples, rápida, prática e econômica. A submissão dos animais ao teste ao longo da semana anterior ao trauma medular facilitou a aplicação do mesmo. Quanto aos avaliadores, o treinamento prévio se mostrou extremamente importante para evitar escores discrepantes atribuídos a um mesmo animal.

Todos os animais, além desse condicionamento prévio, foram avaliados 24 horas antes do procedimento cirúrgico e apresentaram escore máximo, 21, indicando

ausência de anormalidades sensoriais e motoras relacionadas à deambulação antes da primeira cirurgia.

Na avaliação 1, realizada 24 horas após o primeiro procedimento cirúrgico, o grupo CN apresentou escore máximo, enquanto os demais apresentaram déficits neurológicos

graves, com paraplegia e escores caracterizados por movimentação ausente ou discreta em uma ou duas articulações do membro posterior analisado. Não houve diferença estatística entre os grupos que sofreram o trauma medular, assim como ocorreu na avaliação 2 (Fig. 4).

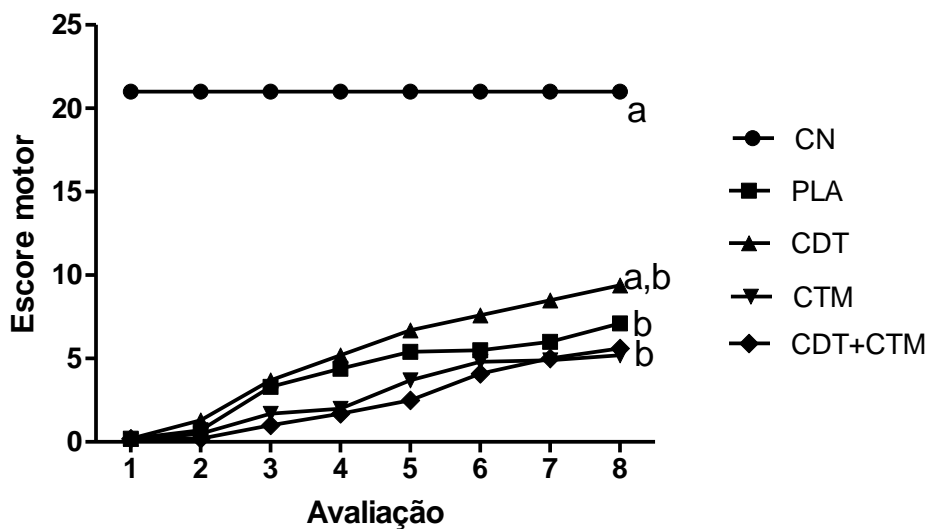


Figura 4. Gráfico com o perfil das medianas dos escores motores de ratos Lewis submetidos à laminectomia ou trauma medular espinal e tratados com células tronco mesenquimais e/ou condroitinase, ou veículo, em cada um dos oito dias da avaliação após o procedimento cirúrgico. (CN=controle negativo, PLA= placebo, CDT= condroitinase, CTM= células tronco mesenquimais e CDT+CTM= condroitinase e células tronco). Observa-se que na oitava avaliação, 28 dias após o trauma, o grupo CDT apresenta escores motores semelhantes ao CN, mas não se difere dos demais grupos. Letras minúsculas diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$).

Na avaliação 3, realizada um dia após a administração intramedular de condroitinase ou placebo, os escores médios foram maiores do que os da segunda avaliação, sugerindo que a aplicação intramedular não causou deterioração da função motora. Até essa avaliação, o grupo CN se diferiu de todos os outros, entretanto, a partir da quarta avaliação, o grupo CDT se igualou ao CN sem, contudo se diferir do PLA.

Na última avaliação, todos os grupos submetidos ao trauma medular

apresentaram escores médios condizentes com a fase inicial de recuperação do teste BBB, onde os membros posteriores arrastavam no chão durante a deambulação e, apresentavam ou não movimentos nas articulações, com amplitude discreta ou extensa. A exceção foi o CDT, que apresentou escore médio pertencente à fase intermediária de recuperação que é caracterizada pela presença de passada dorsal ou plantar com apoio de peso ocasional, consistente ou frequente. Até essa avaliação esse grupo continuou

apresentando resultados semelhantes ao CN, mas sem se diferir do PLA.

6.5. Avaliação da expressão gênica relativa do BDNF, NT-3, VEGF, KDR, PECAM-1 e caspase 3 por RT-PCR em tempo real

Em relação ao número de cópias criadas do RNAm do BDNF, o grupo CTM teve a maior expressão gênica relativa, em seguida os grupos CDT e CDT+CTM tiveram expressões iguais e significativamente maior do que a expressão do PLA (Fig. 5).

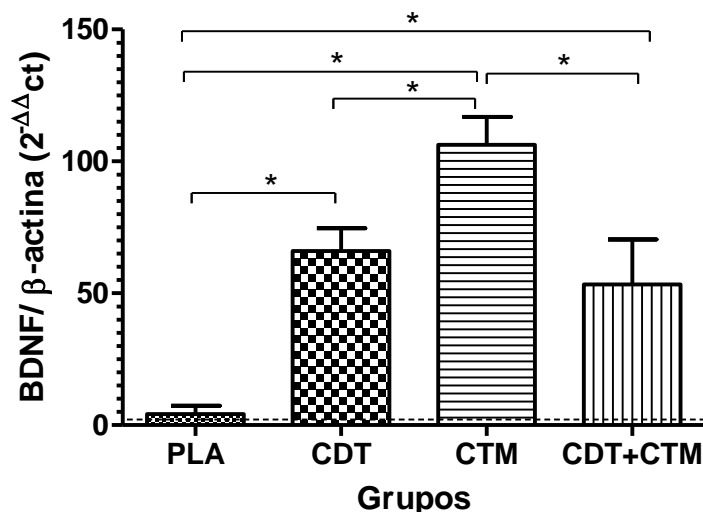


Figura 5. Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de BDNF em grupos de ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * $p < 0,05$.

A análise de variância, considerando a interação entre os grupos e os fatores neurotróficos, constatou que o BDNF e o NT-3 apresentaram o mesmo padrão de distribuição entre os tratamentos, sendo que

em ambos, o grupo CTM teve a maior expressão, enquanto o PLA teve a menor, entretanto, no caso do NT-3 não houve diferença estatística entre os tratamentos (Fig. 6).

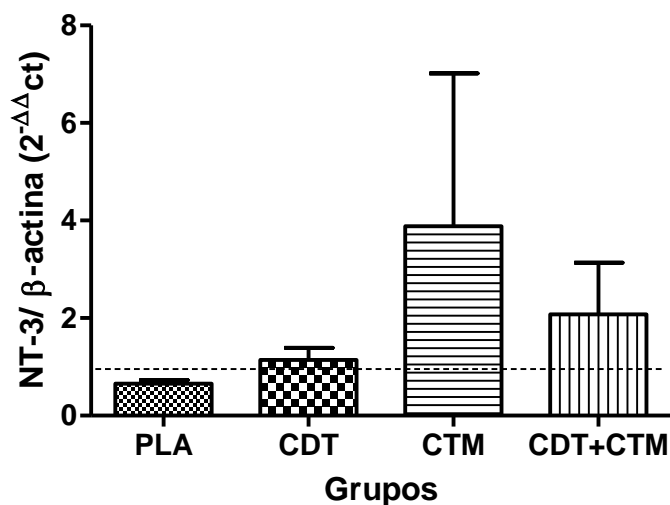


Figura 6. Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de NT-3 em grupos de ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). ($p < 0,05$).

Com relação ao VEGF, o grupo tratado com CTM obteve a maior expressão gênica relativa, sendo que os demais grupos tratados (CDT e CDT+CTM) obtiveram resultados estatisticamente semelhantes ao

PLA (Fig. 7). O gráfico de expressão média do receptor kinase do VEGF, o KDR, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos (Fig. 8).

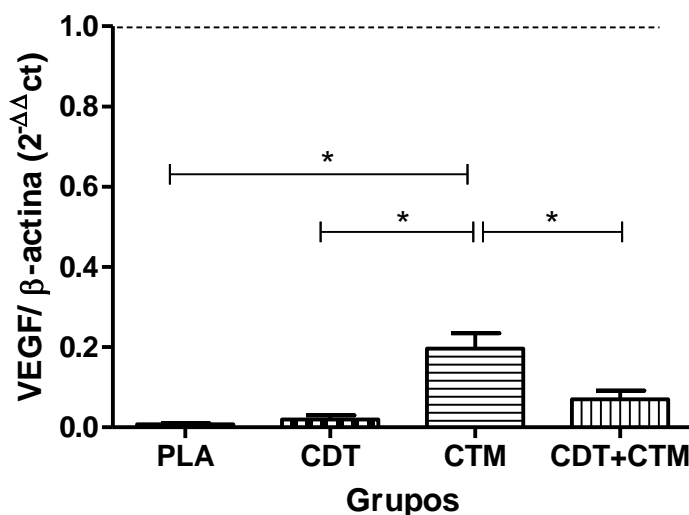


Figura 7. Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de VEGF em grupos de ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * $p < 0,05$.

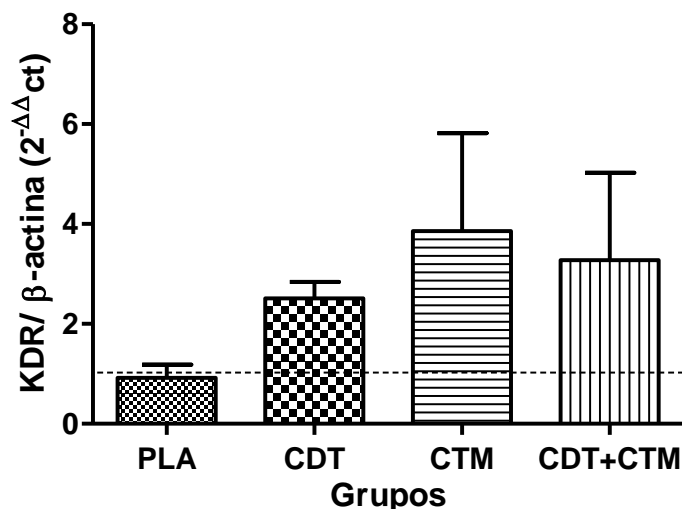


Figura 8. Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) do receptor do VEGF, KDR (*kinase insert domain receptor*), em grupos de ratos submetidos a trauma agudo da medula espinal e tratados com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * $p < 0,05$.

Quanto à molécula de adesão PECAM-1, apesar de sua expressão ter sido maior no

grupo CDT, não houve diferença estatística entre os grupos (Fig. 9).

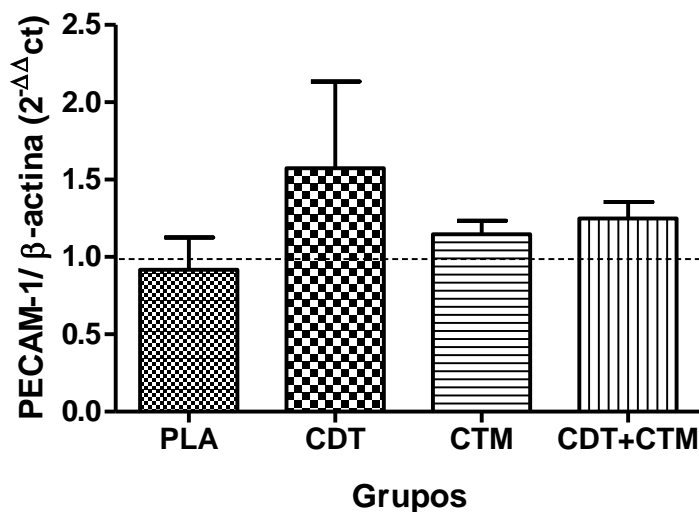


Figura 9. Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de PECAM-1 em grupos de ratos submetidos a trauma agudo da medula espinal e tratados com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * $p < 0,05$.

A expressão gênica da caspase 3 não demonstrou diferença estatística entre os grupos (Fig. 10).

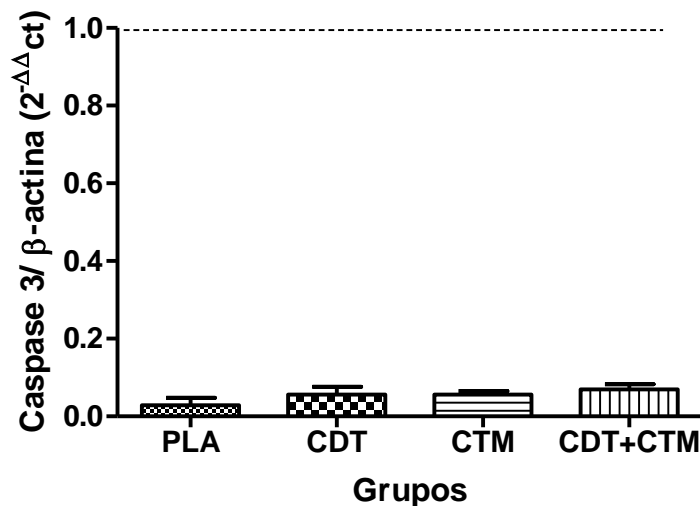


Figura 10. Quantificação relativa das médias da expressão gênica (\pm erro padrão médio) de caspase 3 em grupos de ratos submetidos a trauma agudo da medula espinhal e tratados com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. Os dados estão expressos em relação ao controle negativo (linha tracejada). * $p < 0,05$.

6.6. Avaliação anatomopatológica e imunoistoquímica

Nenhuma alteração macroscópica foi encontrada nos animais à necropsia. O sítio cirúrgico estava totalmente cicatrizado e, na 12^a vértebra torácica pode-se observar o defeito ósseo da laminectomia indicando o local onde, nos animais dos grupos PLA, CDT, CTM e CDT+CTM, foi realizado o trauma mecânico na medula espinhal.

Na avaliação histológica, não foi evidenciada nenhuma alteração nos cortes pertencentes aos animais do grupo CN, corados com HE e avaliados em microscopia óptica. A medula espinhal apresentava características normais, com arquitetura celular preservada, substância cinzenta com o formato característico de

‘H’, ocupando a região interna do órgão, sendo envolvida pela substância branca.

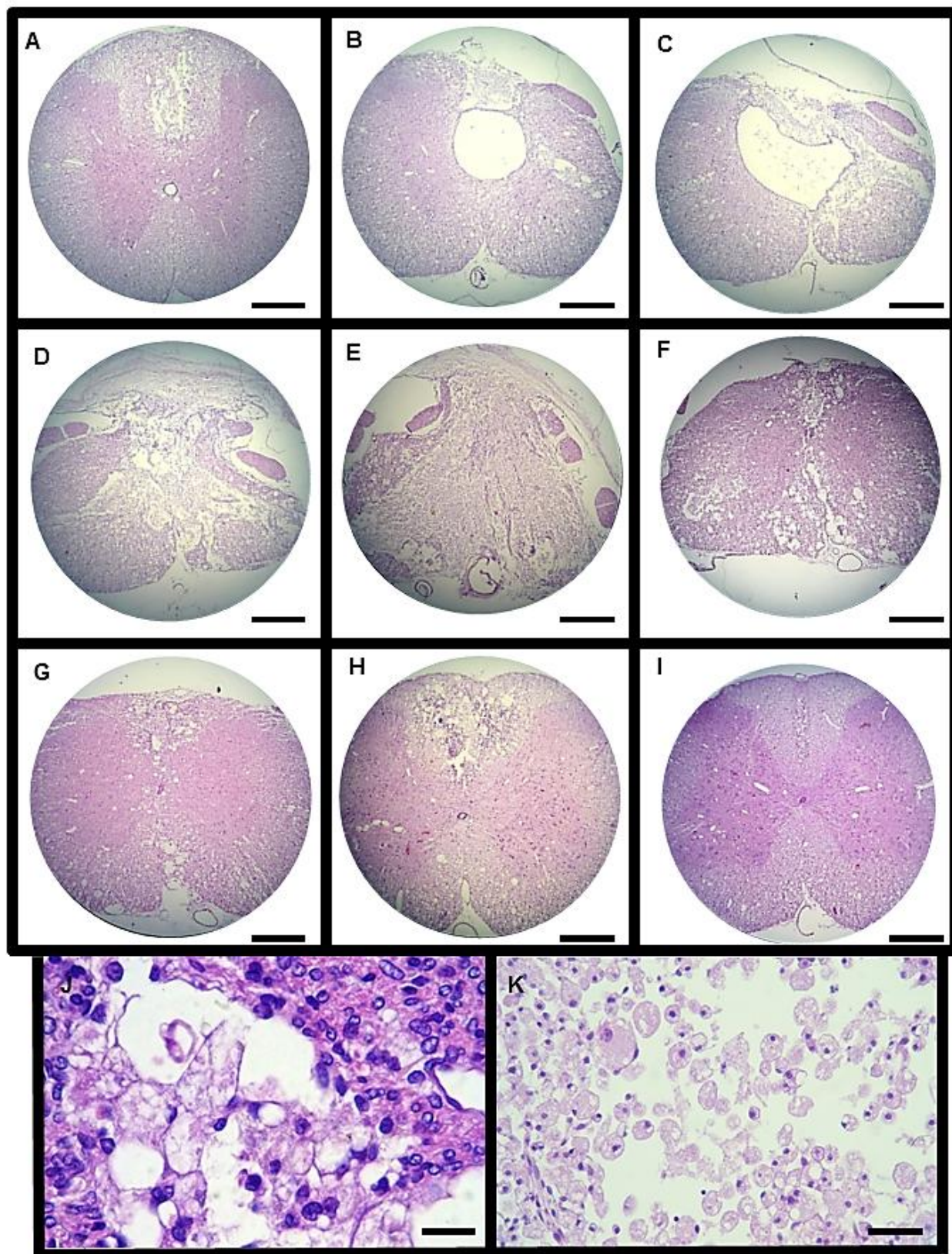
Foram observadas alterações histológicas semelhantes em todos os animais submetidos ao trauma medular, independente do grupo. O corte seriado permitiu boa caracterização da lesão permitindo acompanhar a progressão de sua gravidade por meio da visualização das regiões adjacentes, cranial e caudal, com aspecto normal, e o epicentro da lesão, com alterações bem intensas. Nos cortes mais craniais encontraram-se secções de medula espinhal íntegra e, ao seguir caudalmente, notaram-se vacuolizações, passando por regiões de necrose focalmente extensa que se agravavam progressivamente, até serem encontradas secções com mielomalácia difusa intensa. Prosseguindo com os cortes caudais, verificou-se o processo inverso,

com o retorno gradativo à normalidade tecidual (Fig. 11A-I). Em todos os animais, independente do grupo, foram visualizadas secções histológicas onde a medula espinhal apresentava cavitações com perda de substância associada a células de Gitter, gliócitos reativos (Fig. 11J-K), degeneração e tumefação axonal, além de vasos sanguíneos neoformados, visualizados principalmente nos grupos que receberam condroitinase. Em vários animais, as secções da região cranial ao trauma apresentavam canal central distendido (Fig. 11B-C) e, em alguns deles, na região imediatamente caudal ao epicentro o canal estava diminuído (Fig. 11G). Verificou-se pelo menos uma lâmina por animal na qual a mielomalácia envolvia toda a medula,

sendo considerada a região do epicentro do trauma (Fig. 11E).

Os segmentos da medula espinhal, contendo alterações histológicas, resultaram em média de 18,6 lâminas coradas por HE, sendo o intervalo entre essas lâminas de aproximadamente 440 μM . Dessa forma, a distância média entre a primeira e a última lâmina com alguma alteração histológica foi de cerca de 7744 μM , ou seja, o tamanho médio aproximado da lesão foi de 7,744mm.

Figura 11: Fotomicrografias de secções transversais de cortes seriados da medula espinhal de um rato 30 dias após trauma medular agudo grave. Pode-se observar o agravamento da lesão nas regiões craniais (A a D) até o epicentro (E) e posterior retorno a normalidade tecidual nas secções caudais (F a I). A) Presença de área de mielomalácia focalmente extensa, limitada ao funículo dorsal, com perda de substância; B) e C) Área de necrose focalmente extensa intensa que se estende do funículo dorsal ao lateral da substância branca passando pela substância cinzenta, predominantemente em um dos lados. Distensão intensa do canal central; D) Mielomalácia difusa intensa com áreas de degeneração axonal na periferia da substância branca, predominantemente em um dos lados; E) Mielomalácia difusa F) Mielomalácia multifocal a coalescente intensa que se estende tanto na substância branca quanto na cinzenta; G) e H) Área focalmente extensa de mielomalácia de moderada a intensa no funículo dorsal e ventral associada a áreas de degeneração axonal multifocal moderada em toda substância branca; I) Área de mielomalácia focalmente extensa limitada ao funículo dorsal. (Barra = 264 μm). J) Gliócitos reativos; K) Células de Gitter. (Barra = 17 μm).



Quanto à avaliação imunoistoquímica dos animais com trauma, a marcação dos neurônios com o anticorpo anti-neuN foi maior no grupo CDT+CTM em relação ao PLA. O grupo que recebeu a associação de

tratamentos teve número de neurônios marcados semelhante ao CN, enquanto os demais grupos não se diferiram do placebo (Fig. 12 e 15).

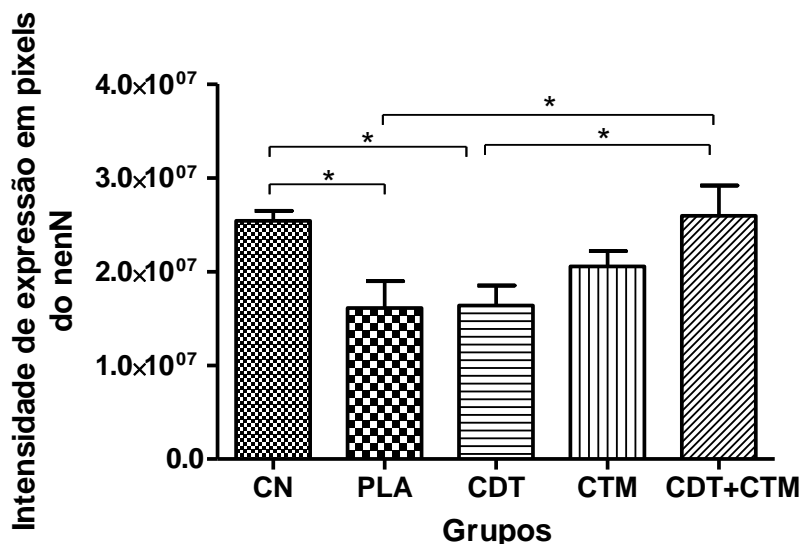


Figura 12: Média da intensidade integrada de pixels (\pm erro padrão médio) da marcação por imunoistoquímica para anticorpo anti-neuN em ratos submetidos à laminectomia (CN) ou trauma medular agudo associado e tratados com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. * $p < 0,05$.

A imunomarcação para o GFAP foi maior nos grupos PLA e CDT+CTM do que no grupo sem trauma (CN), sendo que os

grupos CDT e CTM permaneceram semelhantes tanto ao CN quanto aos grupos PLA e CDT+CTM (Fig.13 e 16).

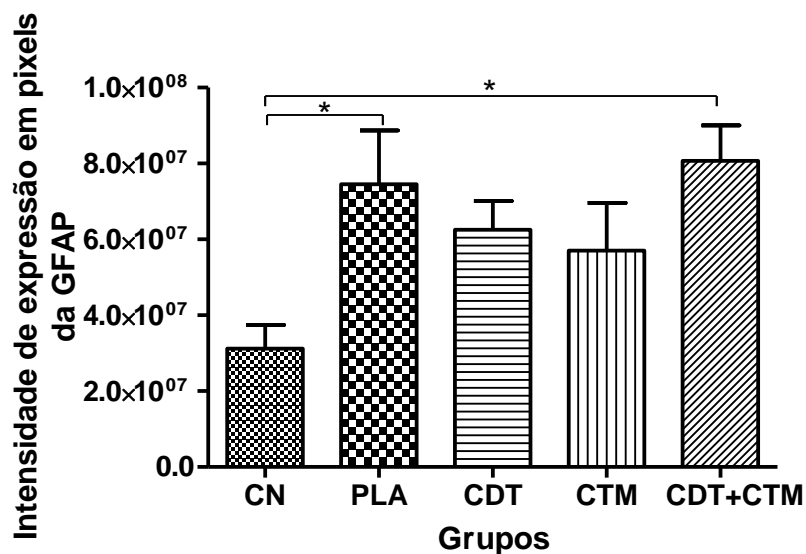


Figura 13: Média da intensidade integrada de pixels (\pm erro padrão médio) da marcação por imunistoquímica para anticorpo GFAP em ratos submetidos à laminectomia (CN) ou trauma medular agudo associado e tratados com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. * $p < 0,05$.

Quanto à vimentina, a imunomarcagem do CN foi menor e se diferiu de todos os grupos com trauma, sendo que entre esses, o CDT teve a menor expressão e foi o único que se diferiu estatisticamente do placebo.

Os demais grupos tratados (CTM e CDT+CTM) tiveram resultados semelhantes tanto ao PLA quanto ao CDT (Fig. 14 e 17).

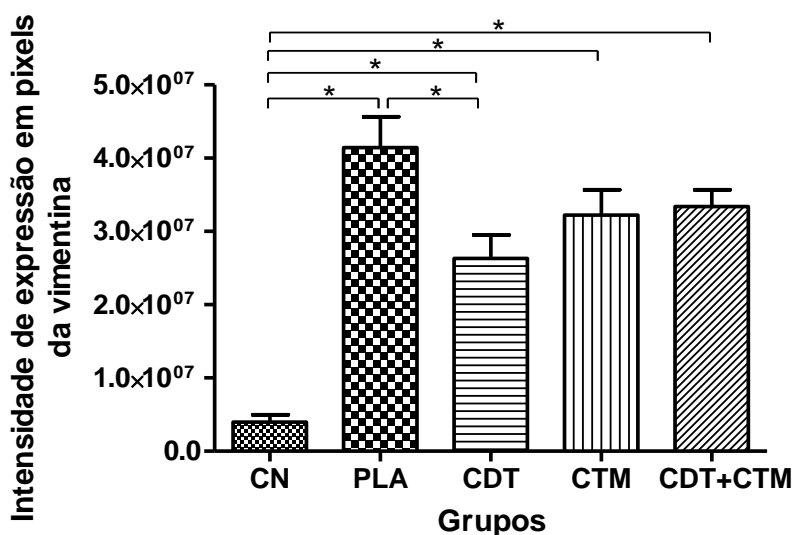


Figura 14: Média da intensidade integrada de pixels (\pm erro padrão médio) da marcação por imunistoquímica para anticorpo anti-vimentina em ratos submetidos à laminectomia (CN) ou trauma medular agudo e tratados com placebo (PLA), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) ou condroitinase mais células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Avaliação realizada 30 dias após o trauma medular. * $p < 0,05$.

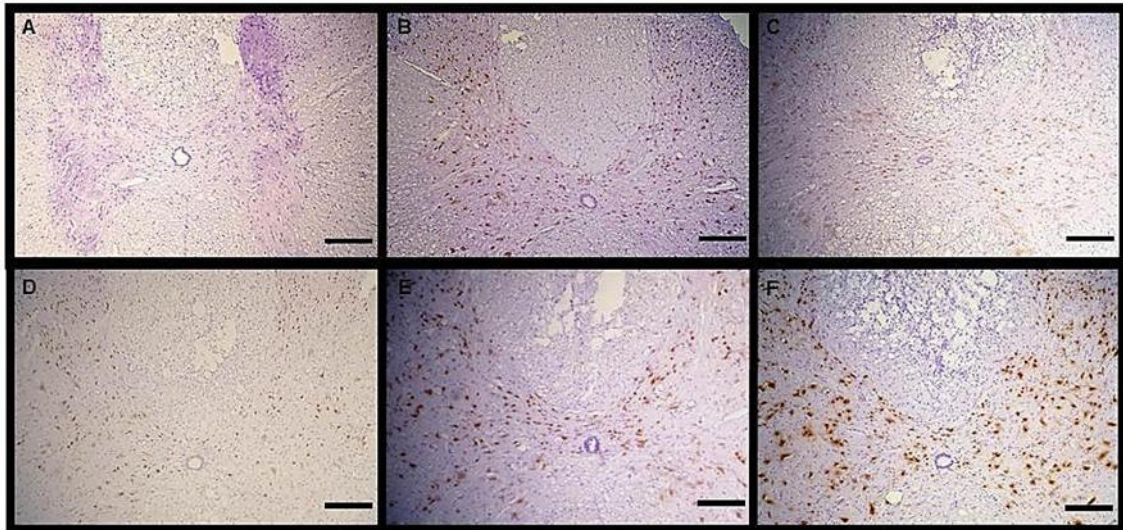


Figura 15: Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos submetidos à imunohistoquímica com anti-nenN 30 dias após a realização da laminectomia, com ou sem trauma medular. A) Controle negativo da bateria, secção que não recebeu o anticorpo; B) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo controle negativo (CN); C) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo placebo (PLA); D) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo condroitinase (CDT); E) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM); F) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo que recebeu a condroitinase e as células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Pode-se observar imunomarcagem intensa nas secções pertencentes a animais dos grupos CN, CTM e CDT+CTM. (Barra = 177 μ m).

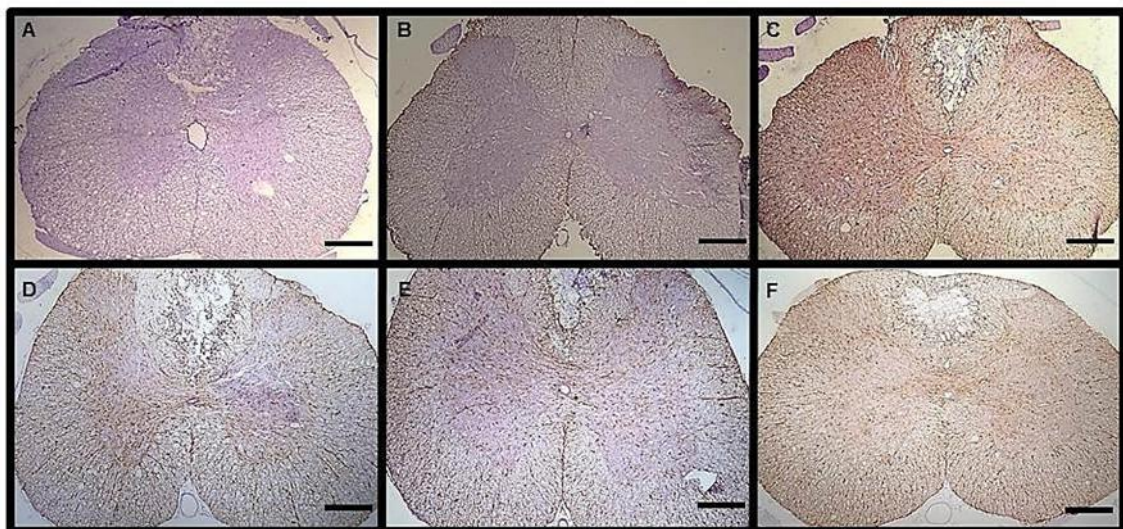


Figura 16: Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos submetidos à imunohistoquímica com anti-GFAP 30 dias após a realização da laminectomia, com ou sem trauma medular. A) Controle negativo da bateria, secção que não recebeu o anticorpo; B) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo controle negativo (CN); C) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo placebo (PLA); D) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo condroitinase (CDT); E) Medula

espinhal de animal pertencente ao grupo células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM); F) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo que recebeu a condroitinase e as células tronco mesenquimais (CDT+CTM). As secções pertencentes aos animais do grupo PLA e CDT+CTM tiveram imunomarcagem maior do que as do CN (Barra = 177 μ m).

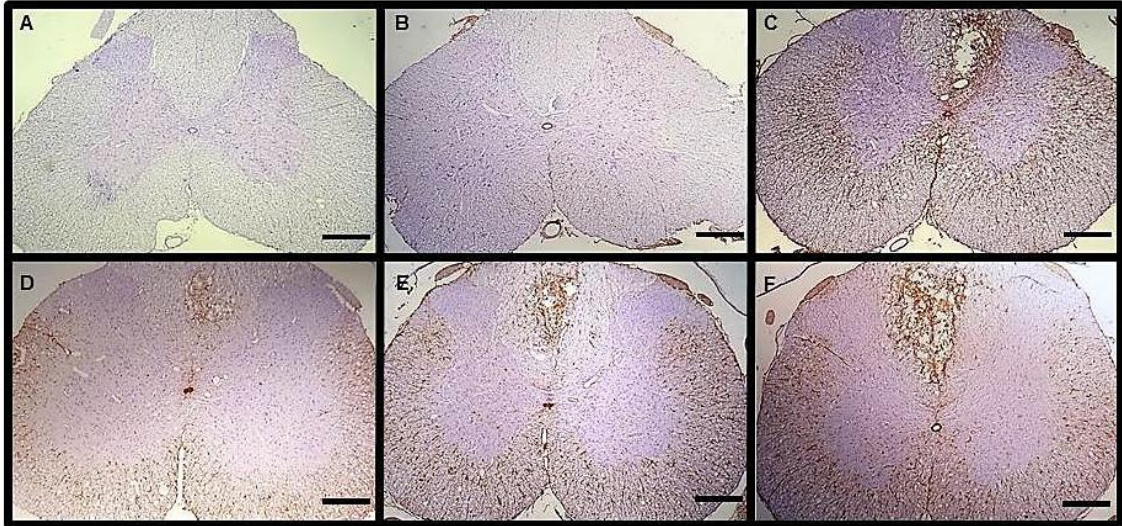


Figura 17: Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos submetidos à imunohistoquímica com anti-vimentina 30 dias após a realização da laminectomia, com ou sem trauma medular. A) Controle negativo da bateria, secção que não recebeu o anticorpo; B) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo controle negativo, submetido à laminectomia sem trauma medular (CN); C) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo placebo (PLA); D) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo condroitinase (CDT); E) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM); F) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo que recebeu a condroitinase e as células tronco mesenquimais (CDT+CTM). Pode-se observar que todas as secções pertencentes a animais submetidos a trauma medular apresentam imunomarcagem mais intensa do que a secção pertencente ao CN e, que a secção do grupo PLA possui imunomarcagem mais intensa do que a do grupo CDT (Barra = 177 μ m).

A imunohistoquímica com o anticorpo GFP permitiu a visualização das células transgênicas para proteína verde fluorescente na medula espinhal dos

animais receptores. As células marcadas não foram encontradas nos animais que não receberam as CTM (Fig. 18).

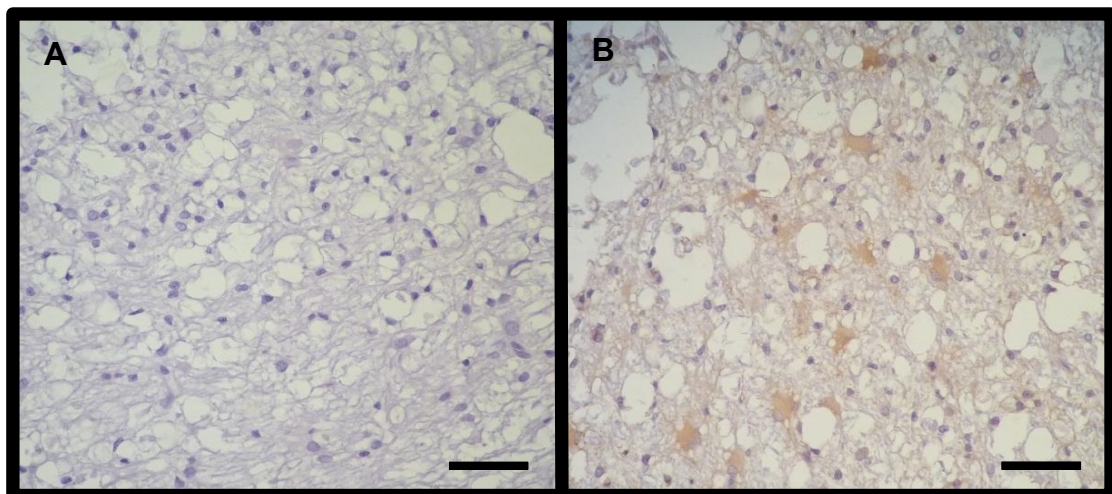


Figura 18: Fotomicrografias de secções transversais da medula espinhal de ratos submetidos à imunistoquímica com anti-GFP 30 dias após a realização da laminectomia com trauma medular. A) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo placebo (PLA); B) Medula espinhal de animal pertencente ao grupo células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM). Pode-se observar imunomarcagem somente na secção pertencentes ao animal do grupo CTM (Barra = 50 µm).

7. DISCUSSÃO

As células cultivadas apresentaram formato típico de CTM, esféricas durante a fase de divisão celular e/ou quando submetidas à ação da tripsina e, espiculadas ao aderirem à garrafa de cultura, como também observado por Maltman et al. (2011) e Quertainmont et al. (2012). Contudo, a confirmação do tipo celular isolado foi feita por meio da citometria de fluxo com os marcadores CD90, CD73, CD54 e CD45, o que permitiu constatar que a população celular isolada e cultivada era homogênea e distinta da linhagem hematopoiética. A confirmação da população de CTM envolve a análise de moléculas de superfície celular, entretanto, ainda não foi definido nenhum marcador específico para esse tipo de célula. Portanto, normalmente é utilizada a monitoração de várias moléculas com o intuito de se criar um perfil de expressão descritivo. A citometria de fluxo é frequentemente utilizada para confirmar o fenótipo das CTM utilizando moléculas que são expressas por essas células (CD29, CD44, CD54, CD55, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117 e CD166), assim como marcadores que sabidamente não são encontrados nas CTM, geralmente antígenos das células hematopoiéticas, como CD11b, CD14, CD31, CD33, CD34 e CD45 (Pittenger et al., 1999; Maltman et al., 2011). Cada grupo de pesquisadores deve escolher os marcadores que são mais adequados ao seu laboratório (Dominici et al., 2006).

Quanto aos protocolos anestésico e cirúrgico utilizados, a ausência de alterações comportamentais nos animais durante o pós-cirúrgico pode ser atribuído à analgesia preemptiva e pós-operatória com cloridrato de tramadol. Também contribuiu para esse fato a boa cicatrização da ferida cirúrgica, que ocorreu sem secreções ou

edemas, provavelmente devido aos princípios de assepsia cirúrgica utilizados rigorosamente no experimento.

As alterações da micção que ocorreram com os animais submetidos ao trauma medular são manifestações comuns após lesão medular (Mitsui et al., 2005; Torres, 2008; Costa, 2010; Caldeira, 2011; Oliveira, 2012) e, muitas vezes, podem levar a cistite e infecções ascendentes do trato urinário. A realização de esvaziamento vesical por meio de massagem abdominal no pós-operatório, assim como o antibiótico profilático, colaboraram para a prevenção de cistite bacteriana clínica e possíveis infecções ascendentes, melhorando o conforto e a sobrevivência dos animais. Essas disfunções vesicais ocorrem porque as funções do trato urinário inferior dependem de circuitos neurais localizados na medula lombossacra, incluindo as projeções aferentes da bexiga no corno dorsal, o motor somático dorsolateral e o núcleo parassimpático que coordenam as atividades da bexiga, uretra e esfíncter uretral. Essas regiões na medula lombossacra são inervadas por vias descendentes oriundas do tronco cerebral, como axônios contendo fator liberador de corticotrofina e axônios serotoninérgicos e noradrenérgicos. Lesões espinhais acima do nível lombossacral danificam as vias descendentes e alteram as vias aferentes primárias para a medula lombossacral, prejudicando assim a função do trato urinário inferior (Mitsui et al., 2005). A hematúria é um sinal precoce de cistite hemorrágica e, pode levar a distensão e dificuldade para expressão vesical devido a formação de coágulos que obstruem as vias urinárias (Meyer et al., 2003).

Em relação à administração intramedular de CDT, assim como observamos nesse experimento, Iseda et al. (2008), Tom et al.

(2009) e Jefferson et al. (2011) também constataram que é uma forma viável de administração da enzima. Tom e Houlé (2008) demonstraram que essa via de aplicação é relativamente atraumática e não causa resposta inflamatória considerável. Alguns autores relatam o risco de deterioração neurológica ao utilizar essa via (Paul et al., 2009; Guest et al., 2011; Whight et al., 2011), contudo, a administração única, o pequeno volume injetado (4 μ L), a baixa velocidade (0,8 μ L/min) e com agulha fina (30 G), são fatores que podem ter contribuído para a preservação da função motora no presente estudo.

A aplicação da CDT nesse estudo, em dose única de 2,2U, sete dias após a lesão medular, foi baseada em dados que sugerem sucesso na aplicação nesse período (Garcia-Alías et al., 2008), ressaltando que a atividade da enzima ainda se mantém cerca de 50% após sete dias de sua administração (Ikegami et al., 2005). Apesar de muitos trabalhos utilizarem a CDT em doses múltiplas, ficou comprovado por Iseda et al. (2008) que dose única administrada *in bolus* pode digerir os PGSC durante várias semanas *in vivo*. Nesse último trabalho, a enzima foi aplicada diretamente na medula, a dose total de 3,375U foi dividida em três sítios de administração, sendo 1,125U injetada no epicentro da lesão e dose igual nas regiões cranial e caudal. Entretanto, existe enorme variação em relação à dose na literatura. Alguns autores utilizaram a via intramedular em ratos com aplicação de 0,04U a cada dois dias durante quatro dias (Tom e Houlé, 2008) ou a dose única de 0,1U a 0,225U (Tom et al., 2009). Já as doses aplicadas por via intratecal variaram de 0,06U a cada dois dias durante 10 dias (Brandbury et al., 2002; Shields et al., 2008) a 0,3U a cada dois dias durante 14 dias (Huang et al., 2006).

Rools et al. (2008) determinaram que a inibição dos PGSC, imediatamente após a lesão medular em ratos comprometeu a recuperação funcional motora e aumentou a perda tecidual. Essa inibição alterou a organização espacial do infiltrado de células mielóides em volta do local da lesão, levando a diminuição do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) produzido pela micróglia/macrófagos e, causou aumento dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Em contraste, quando eles inibiram a síntese dos PGSC somente dois dias após a lesão, a recuperação funcional foi melhorada. Esses autores verificaram assim que os PGSC são requeridos nos estágios iniciais da recuperação para ativação da micróglia/macrófagos, possivelmente por limitar a extensão dos danos criando uma barreira física, enquanto que na fase crônica, eles inibem o crescimento axonal e a regeneração. Esse resultado indica que o efeito dos PGSC após uma lesão medular não é um fenômeno 'tudo ou nada', mas uma função de tempo e quantidade. Assim, é possível explicar alguns dos resultados descritos na literatura, nos quais, várias condições de degradação enzimática levam a diferentes estágios de recuperação. Dessa forma, uma importante consideração para o desenvolvimento de estratégias que visam a ablação da cicatriz glial é definir uma janela terapêutica apropriada para a terapia (Hu et al., 2010), assim como a dose e frequência ótimas de administração (Shields et al., 2008).

Quanto à via de aplicação das CTM, optouse pela intravenosa, pois os animais já haviam sido submetidos a duas cirurgias, sendo uma delas para realização de injeção intramedular. A imunomarcação com GFP verificou a presença dessas células na medula espinhal dos animais receptores, demonstrando que após serem injetadas na

veia caudal elas migraram até a área lesionada da medula espinhal e, permaneceram lá por pelo menos 16 dias após sua inoculação, momento em que foi realizada a imunoistoquímica. A via intravenosa é considerada menos traumática, mais viável clinicamente e tem demonstrado resultados favoráveis em estudos de trauma medular (Xin-min et al., 2005; Takeuchi et al., 2007; Mahoney et al., 2009; Osaka et al., 2010; Carvalho, 2011; Han et al., 2012), cerebral (Chen et al., 2001; Mahmood et al., 2005; Walker et al., 2010) e isquemia cerebral (Honma et al., 2006).

Em modelos animais de trauma espinhal, o método comumente empregado para o transplante de células é a injeção intramedular (Hofstetter et al., 2002; Dasari et al., 2007; Parr et al., 2008; Kamada et al., 2011), a qual garante a chegada de número definido de células ao local alvo, possibilitando maior eficiência das células aplicadas (Vaquero et al., 2006; Paul et al., 2009; Vaquero e Zurita, 2011). Contudo, essa via exige procedimento cirúrgico com retirada da lâmina dorsal da vértebra, o que implica na possibilidade de lesão adicional à medula com deterioração neurológica (Paul et al., 2009; Whight et al., 2011), além dos riscos advindos da anestesia geral, que são maiores em pacientes com lesão medular (Hambly e Martin, 1998). A injeção em si pode causar injúrias devido à penetração da agulha, movimentação da medula ou da agulha durante a aplicação, criação de gradiente de pressão intraparenquimal e dissecação hidrodinâmica, instilação de uma massa de células deformante e possível isquemia medular (Guest et al., 2011). Em casos que necessitem de múltiplas aplicações, as dificuldades e os riscos aumentariam progressivamente a cada acesso cirúrgico devido à formação de cicatriz, inflamação e

adesão na dura-máter e no tecido espinhal. Dessa forma, pode ser bastante complicado transportar a aplicação de células por meio de injeção intramedular para a prática clínica (Paul et al., 2009).

O emprego clínico do transplante celular requer estratégia segura e eficiente para administração das células (Paul et al., 2009). A injeção intravenosa tem a vantagem de ser minimamente invasiva, segura, fácil e simples de ser praticada, e permitir a introdução de grande número de células que podem potencialmente atingir a área da lesão medular (Osaka et al., 2010). Como as CTM possuem tropismo para tecidos danificados, essa característica pode dispensar a necessidade de injetar as células diretamente no local da lesão (Syková e Jendelová, 2007; Spaeth et al., 2008 citado por Wright et al., 2011). Embora no estudo de Oliveira et al. (2013), tenha se constatado o efeito benéfico da terapia intravenosa das células, sem comprovar seu alojamento no sítio da lesão, tem se demonstrado que as células podem migrar em direção ao tecido danificado e integrá-lo (Paul et al., 2009; Osaka et al., 2010; Carvalho, 2011) promovendo recuperação funcional (Mahmood et al., 2005; Xin-min et al., 2005; Vaquero et al., 2006; Osaka et al., 2010; Carvalho, 2011), remielinização (Akiyama et al., 2002) e podendo se diferenciar em células neuronais ou gliais (Takeuchi et al., 2007).

O mecanismo preciso de migração das células infundidas para a área danificada ainda não é completamente esclarecido, mas provavelmente envolve a interrupção da barreira hemato-espinal (Chen et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Osaka et al., 2010), que pode permanecer comprometida por semanas após o trauma (Popovich et al., 1996; Whetstone et al., 2003) permitindo a entrada seletiva de células no epicentro da

lesão. Takeuchi et al. (2007) observaram que células tronco neuronais humanas implantadas por via intravenosa com três, sete ou 10 dias após o trauma medular em ratos migraram para o sítio da lesão, principalmente quando aplicadas no sétimo dia, coincidindo com o pico de expressão de mRNA do fator de crescimento do hepatócito (HGF) e do fator 1 derivado de células estromais (SDF-1). As células foram detectadas por imunofluorescência, sete dias após a aplicação, no local da injúria e nenhuma célula foi detectada em localização rostral, caudal ou ventral ao epicentro. Mahmood et al. (2005) demonstraram que células estromais da medula óssea humana aplicadas via intravenosa para tratamento de lesão cerebral traumática em ratos, sobreviveram e promoveram recuperação funcional por pelo menos três meses. Em concordância, Vaquero et al. (2006) também observaram melhora funcional em ratos paraplégicos que receberam células estromais da medula óssea na veia dorsal da cauda três meses após o tratamento, embora tenham verificado melhora mais intensa e durante período mais prolongado, de seis meses, nos animais que receberam as células diretamente na lesão. Contudo, esses últimos autores administraram o mesmo número de células (3×10^6) em ambas as vias em período crônico, três meses após a lesão medular, o que não favoreceu a migração das células para o local da lesão (Osaka et al., 2010; Vaquero e Zurita, 2011).

Em geral, as células infundidas nos vasos estão vulneráveis ao sistema imunológico. A eliminação parcial dessas células pelo sistema imune do receptor, enquanto estão na corrente sanguínea é uma das explicações para a menor eficiência da via venosa (Paul et al., 2009), pois o efeito terapêutico das células parece ser dose-

dependente (Honma et al., 2006; Vaquero e Zurita, 2011). Corroborando esse fato, Mahmood et al. (2003) citado por Mahmood et al. (2005) demonstraram melhora funcional com administração intravenosa de 2×10^6 células estromais da medula óssea humana um mês após injúria traumática cerebral, entretanto o mesmo não foi detectado com a injeção de 1×10^6 células. Já Osaka et al. (2010) observaram melhora funcional em ratos com lesão medular após a aplicação intravenosa de 1×10^6 CTM no 14º dia após a lesão, período mais precoce do que Mahmood et al. (2003) e, semelhante ao utilizado nesse estudo.

Além disso, grande preocupação que envolve a aplicação intravenosa de células é a distribuição inadequada para outros órgãos como efeito de primeira passagem (Paul et al., 2009). Esse efeito não foi observado por Paul et al. (2009) que injetaram 1×10^6 células estromais da medula óssea humana por via intravenosa em ratos, um dia após a lesão medular experimental. Depois de quatro ou 21 dias, as células foram localizadas na região dorsomedial e dorsolateral da substância branca no sítio da lesão, sendo que nenhuma célula foi detectada na região cranial ou caudal à lesão ou no encéfalo, assim como não foram encontradas células nos órgãos não neuronais examinados: coração, pulmão, fígado e rins. Chen et al. (2001) encontraram pouquíssimas células em outros órgãos um dia após a administração intravenosa de 3×10^6 CTM em experimento de isquemia cerebral, sendo que a maioria dessas células se encontravam dentro dos vasos sanguíneos. Eles também verificaram que as células injetadas se dirigiam principalmente para o hemisfério isquêmico em relação ao normal. Takeuchi et al. (2007), após a infusão de 1×10^7 células tronco neuronais, detectaram algumas células no fígado,

pulmão e rim quando injetadas três dias após o trauma medular, entretanto, quando elas foram infundidas após sete ou 10 dias da lesão, não foram encontradas nesses órgãos. Contudo, no presente estudo, assim como nos citados acima não foi observado qualquer efeito colateral que possa ser correlacionado com a presença das células em órgãos não desejados.

Considerando a recuperação funcional, o teste de avaliação da capacidade motora pela escala de escores BBB foi escolhido por ser uma das ferramentas mais comuns e aceitas para avaliar os resultados, a progressão e/ou recuperação de lesões medulares experimentais em ratos (Ma et al., 2001; Agrawal et al., 2008; Sedy et al., 2008). Além disso, ele é padronizado e apresenta resultados realistas, confiáveis (Basso et al., 1996b) e correlacionados com as alterações histopatológicas (Ma et al., 2001). Apesar do BBB não requerer treinamento prévio dos animais, por se basear em seus movimentos naturais (Basso et al., 1995; Basso et al., 1996a; Muir e Webb, 2000), foi constatado que o condicionamento minimizou a ocorrência de estresse e, conforme observado por Basso et al. (1995), aumentou a movimentação do rato no campo aberto. Em concordância com esses autores, Sedy et al. (2008) verificaram que embora o treinamento não seja necessário, ele é altamente recomendado.

Assim como Basso et al. (1996a) também constatou-se que o treinamento prévio dos avaliadores é extremamente importante para evitar escores discrepantes atribuídos ao mesmo animal, influenciando diretamente na confiabilidade dos escores. Essa dificuldade na interpretação do BBB ocorre devido à subjetividade dos parâmetros analisados que podem levar a dupla interpretação. Contudo, verificou-se nesse

estudo que o treinamento rigoroso dos avaliadores, de forma a padronizar os escores, minimiza a subjetividade, especialmente quando a avaliação é feita por dois avaliadores independentes, fato também observado por Muir e Webb (2000), Agrawal et al. (2008) e Sedy et al. (2008).

Durante todo o período de avaliação da capacidade motora não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos que sofreram lesão medular. O grupo CN apresentou escores máximos na escala BBB em todas as avaliações.

Na avaliação '1', realizada 24 horas após o primeiro procedimento cirúrgico, o escore 21 do grupo CN atesta que os animais não sofreram lesões devido ao procedimento cirúrgico de acesso à medula espinhal com laminectomia dorsal confirmando que a técnica foi realizada de maneira cuidadosa e precisa. Giglio et al. (2006) relataram pequenas alterações em testes comportamentais em ratos submetidos a laminectomia, fato que não foi observado nos estudos da EV-UFMG (Silva, 2006; Torres, 2008; Drummond, 2010; Costa, 2010; Caldeira, 2011; Fukushima, 2012; Oliveira, 2012). Os grupos submetidos ao trauma apresentaram déficits neurológicos graves nessa avaliação, com paraplegia e escores caracterizados por movimentação ausente ou discreta em uma ou duas articulações do membro posterior analisado. Não houve diferença estatística entre os grupos que sofreram o trauma medular, o que indica padronização e homogeneidade do trauma entre os animais, e confirma a precisão do modelo de lesão medular utilizado.

Na avaliação '3', realizada um dia após a administração intramedular de condroitinase ou placebo, os escores médios

foram maiores do que os da avaliação '2', sugerindo que a aplicação intramedular não causou comprometimento adicional da função motora. Esse achado foi interessante, pois sugere que a administração intramedular, apesar de ser invasiva e requerer procedimento cirúrgico adicional, pode ser ferramenta terapêutica viável, pois não resulta em deterioração da função motora. Resultados semelhantes foram encontrados por Parr et al. (2008) com a injeção de 5 µL de células tronco em suspensão a velocidade de 2,5 µL/min na região cranial e caudal à lesão medular; por Hofstetter et al. (2002) que aplicaram 5 µL de células tronco em suspensão no epicentro da lesão medular, associado a 2,5 µL cranial e 2,5 µL caudal, a velocidade de 0,5 µL/min e, por Dasari et al. (2007) e Kamada et al. (2011) que também administraram o volume de 5 µL na medula espinhal de ratos sem manifestação de danos a função motora.

Outro fato interessante é que até a avaliação '3', o CN se distinguiu dos demais, entretanto a partir da avaliação '4', o grupo CDT se igualou estatisticamente a ele e, se manteve assim até a última avaliação, 28 dias após o trauma medular. Era esperado que o CN fosse superior aos outros em todas as avaliações, pois enquanto o primeiro foi submetido apenas a laminectomia, os demais sofreram trauma medular grave. Segundo Taoka e Okajima (1998), a lesão medular experimental compressiva produz paralisia caudal parcialmente reversível e que geralmente a função motora melhora gradualmente, mas não completamente. Embora não tenha apresentado recuperação completa e nem se diferido do placebo, o grupo CDT apresentou a melhor recuperação funcional e, esse resultado pode ser indicativo de uma possível ação benéfica da enzima na função motora. Essa

ação talvez possa ser atribuída à digestão enzimática dos PGSC da cicatriz glial reduzindo seu efeito inibitório no crescimento axonal e/ou ser decorrente de possível efeito da enzima na matriz extracelular que, ao torna-la mais propícia à invasão por células endoteliais, levaria à maior vascularização com consequente aporte de nutrientes, diminuição ao dano secundário e neuroproteção.

A recuperação funcional, após traumas medulares experimentais não apresenta resultados homogêneos na literatura consultada. Em relação à condroitinase, enquanto alguns autores relatam melhor recuperação funcional (Brandbury et al., 2002; Huang et al., 2006; Garcia-Alias et al., 2008; Tester e Howland, 2008; Huang et al., 2010; Lee et al., 2010), outros descrevem crescimento axonal mas sem incremento funcional (Tom et al., 2009). Garcia-Alias et al. (2009) embora não tenham observado melhora em testes comportamentais em ratos com lesão medular tratados com condroitinase, verificaram que a enzima associada a treinamento fisioterápico específico, resultou em aumento da capacidade de adaptação do membro pós-lesão e do desempenho quando comparada a essas terapias aplicadas isoladamente, semelhante ao encontrado por Jefferson et al. (2011) em gatos.

Quanto à ação das células no escore motor, alguns trabalhos relataram melhora rápida após a aplicação (Dasari et al. 2007; Osaka et al., 2010; Carvalho, 2011), outros estudos encontraram escores maiores somente após cinco (Hofstetter et al., 2002; Kamada et al., 2011) ou sete (Lee et al., 2007) semanas do trauma; e ainda algumas pesquisas não relataram qualquer melhora funcional (Lu et al., 2005; Parr et al., 2008) mesmo avaliando os animais por seis

semanas ou mais após o trauma. Caldeira (2011) verificou que os animais tratados com CTM obtiveram melhor desempenho nesse teste a partir do 20º dia pós trauma, entretanto no 40º dia os escores entre o grupo tratado e o placebo se igualaram. Contudo, é difícil comparar os resultados entre os trabalhos, pois os traumas experimentais são diferentes, assim como os tratamentos, períodos, doses e vias de aplicação.

Esperava-se que os grupos tratados apresentassem melhor desempenho locomotor, pois, tanto a terapia celular (Ohta et al., 2004; Vaquero et al., 2006; Dasari et al. 2007; Osaka et al., 2010) quanto a condroitinase (Huang et al., 2006; Tester e Howland, 2008; Lee et al., 2010; Jefferson et al., 2011), ou a associação (Huang et al., 2010; Karimi-Abdolrezaee et al., 2010) têm demonstrado resultados funcionais em lesões medulares. A recuperação motora é o resultado da combinação de regeneração, brotamento e alterações na plasticidade, sendo assim, depende da interação adequada entre as vias remanescentes (Rossignol e Frigon, 2011). Dessa forma, supunha-se que a ação dos fatores tróficos propiciaria neuroproteção com maior preservação dessas vias e, ambiente mais propício à regeneração por maior aporte nutricional pela angiogênese ou diminuição da cicatriz glial. Adicionalmente, as células serviriam de apoio ao brotamento axonal, favorecendo a plasticidade com consequente recuperação funcional, fato que não foi constatado. A ausência de resultados positivos na recuperação locomotora dos animais tratados, possivelmente pode ser atribuída a algum dos seguintes fatores: método e período de avaliação; gravidade da lesão medular experimental, ou mesmo protocolo terapêutico não adequado para promover melhora na deambulação.

Considerando o método de avaliação, a recuperação funcional pode ter ocorrido de forma bastante sutil e, talvez não tenha sido detectada pelo BBB. Embora esse teste seja altamente utilizado e aceito para análise de lesões medulares (Basso et al., 1996b; Ma et al., 2001), alguns autores sugerem que ele deve ser associado a outros para interpretação mais precisa (Muir e Webb, 2000; Giglio et al., 2006; Sedy et al., 2008), principalmente no caso de traumas dorsais à medula espinhal, onde as vias sensoriais são bastante atingidas (Agrawal et al., 2008), lembrando que a porção ventral possui principalmente função motora, enquanto a dorsal é mais sensorial (Hoerlein et al., 1983). As lesões dorsais e dorsolaterais na medula espinhal atingem ainda as vias corticoespinhal e rubroespinhal, que desempenham papel importante para os aspectos volitivos e alvo-dirigidos da locomoção, assim como o controle fino da musculatura distal. Elas também parecem desempenhar papel crítico em tarefas locomotoras mais difíceis como desviar de obstáculos e andar em escadas. As vias corticoespinhais estão envolvidas em movimentos que exigem habilidade e precisão, assim como em movimentos antecipatórios (Rossignol e Frigon, 2011), e no posicionamento exato do pé durante cada passada (Boulenguez e Vinay, 2009). Dessa maneira, avaliações sensoriais e testes que demandem maior aptidão para execução dos movimentos podem ser bastante úteis como complementares ao BBB.

Muir e Webb (2000) indicaram quando há escores do BBB entre zero e nove, a inclusão de testes como a natação (*swimming*) e uso espontâneo da pata (*spontaneous paw use*), no qual é mensurada a utilização individual de cada membro. Nesse caso, eles ressaltaram que

avaliações sensoriais devem ser realizadas, como por exemplo, teste do papel colante, teste de retirada da cauda e teste de lambadura da pata, e se necessário, os resultados podem ser medidos mais precisamente utilizando técnicas eletrofisiológicas. Agrawal et al. (2008) sugeriram a utilização da mensuração eletrofisiológica usando o potencial somatossensitivo evocado como avaliação suplementar, por ser mais objetivo, sensível e detalhado do que o BBB, entretanto, essa análise exige instrumentação específica, requer preparação de eletrodos e processamento de biossinais. Em concordância com esses autores, Moore (1992) ressaltou que apesar da deambulação fornecer informações importantes sobre a existência de alterações neurológicas, algumas vezes as anormalidades visualizadas podem ser bem sutis e subjetivas e, que a aplicação de outros testes neurológicos pode ajudar a percebê-las.

O período de avaliação de 28 dias após o trauma, pode não ter sido suficiente para a visualização dos efeitos dos tratamentos na capacidade motora. Hu et al. (2010) demonstraram que a recuperação anatômica e funcional atinge seu platô quatro semanas após a lesão. Esses autores avaliaram animais sem tratamento durante 16 semanas por meio do teste BBB, testes eletrofisiológicos, ressonância magnética e histologia, e demonstraram que o escore do BBB diminuiu drasticamente no primeiro dia após a lesão, seguido de recuperação gradual com ápice na quarta semana. Esse fato foi verificado no grupo placebo do presente estudo, pois os animais foram avaliados justamente no período de maior recuperação espontânea. Com base nesses resultados, poderíamos esperar que após essa fase, o grupo placebo apresentaria resultados inerciais, devido à estagnação da

recuperação espontânea, enquanto os outros grupos continuariam a evoluir, usufruindo dos efeitos dos tratamentos. Reforçando essa teoria, Hofstetter et al. (2002), Lee et al. (2007) e Kamada et al. (2011) só conseguiram obter escores do BBB mais altos nos grupos tratados com células tronco nas avaliações após cinco ou mais semanas do trauma. Estudos que relataram recuperação funcional com o transplante de CTM da medula óssea e a observaram precocemente, duas ou três semanas após a lesão, sugeriram a ocorrência de neuroproteção mais relevante do que ação regenerativa. Tem sido postulado que a neuroproteção pode ocorrer como resultado da produção de fatores de crescimento pelas células transplantadas (Parr et al., 2008). Contudo, assim como ocorreu com Parr et al. (2008), é possível que a lesão causada à medula espinhal nesse experimento tenha sido tão acentuada que impediu a ocorrência de qualquer neuroproteção e, que o tempo avaliado tenha sido insuficiente para perceber os possíveis efeitos benéficos na plasticidade, remielinização e regeneração neuronais.

Considerando a avaliação da expressão gênica dos fatores tróficos BDNF, NT-3, VEGF e seu receptor KDR, um fato interessante é que todos os gráficos são parecidos, sendo que em todos a menor coluna é a do grupo PLA e, a maior, a do CTM. O grupo CTM teve expressão significativamente maior dos fatores BDNF e VEGF, apresentando resultado mais favorável que a sua combinação com a condroitinase. O grupo CDT apresentou maior expressão de BDNF do que o placebo, embora menor do que o CTM.

Os astrócitos reativos, por meio da captação de glutamato, limpeza dos radicais livres, e síntese de neurotrofinas e hormônios, protegem os tecidos e preservam as funções

nos períodos iniciais após lesões do sistema nervoso central (Sofroniew, 2005 citado por Hu et al., 2010). A astrogliose também pode propiciar a regulação extracelular de íons, controlar a liberação de neurotransmissores e permitir reparação da matriz (García-Alías et al., 2009). No presente estudo, a condroitinase foi administrada em uma fase inicial após o trauma, com menos de quatro semanas, o que segundo Hu et al. (2010) agiria inibindo essa ação benéfica dos astrócitos e, conseqüentemente sua síntese de neurotrofinas. Apesar disso, o grupo tratado teve expressão maior dos fatores benéficos oriundos da ação dos astrócitos em relação ao grupo placebo, em desacordo com o autor citado.

As neurotrofinas desempenham papel crucial em vários aspectos da função neural, incluindo sobrevivência, desenvolvimento, funcionamento e plasticidade (Chen et al., 2005; Balaratnasingam e Janca, 2012). O BDNF, o fator de crescimento do nervo (NGF), a NT-3 e a neurotrofina-4 (NT-4) são neurotrofinas essenciais conhecidas por promover sobrevivência neuronal (Webb et al., 2010). O BDNF e a NT-3 ainda induzem o crescimento de neuritos, e aumentam a expressão de enzimas que sintetizam neurotransmissores (Mocchetti e Wrathall, 1995 citado por Chen et al., 2005). Além disso, o BDNF, neurotrofina mais abundante e abrangente no sistema nervoso central de mamíferos, tem a capacidade de inibir a apoptose neuronal sendo essencial para o seu bom funcionamento (Balaratnasingam e Janca, 2012; Han et al., 2012). Nesse contexto, talvez fosse esperado que o grupo CTM que apresentou maior expressão do BDNF tivesse maior imunomarcagem de neuN, menor de caspase 3 e melhor recuperação locomotora. Entretanto, a expressão gênica é um evento precoce e, após sua ocorrência,

o BDNF precisa ser constituído e ter tempo para agir, principalmente no caso da função motora que seria consequência mais tardia do aumento da expressão dessa neurotrofina.

Observa-se que a expressão gênica das neurotrofinas possui inserção bastante controversa. Diversos estudos demonstraram aumento local na expressão de BDNF (Lu et al., 2005; Rodrigues Hell et al., 2009; Osaka et al., 2010) após aplicação de células em ratos com lesão medular, enquanto, Caldeira (2011) ao avaliar medulas espinhais duas, três ou cinco semanas após a aplicação de CTM da medula óssea não detectou expressões aumentadas de BDNF ou NT-3. A recuperação correlacionada com o aumento dessas neurotrofinas também não é consenso na literatura. Osaka et al. (2010) correlacionaram os níveis maiores encontrados com melhor desempenho na capacidade motora e, Sasaki et al. (2009) demonstraram que células geneticamente modificadas para secretar mais BDNF proporcionavam maior crescimento dos axônios acompanhado de recuperação funcional. Por outro lado, corroborando os achados do presente estudo, Lu et al. (2005) encontraram aumento dos níveis de BDNF no grupo que recebeu células, mas não observaram recuperação funcional e, atribuíram esse achado ao fato que o crescimento axonal se limitou ao sítio da lesão e não se estendeu além dele, o que também pode ter ocorrido nesse experimento.

Não está bem estabelecido se as células transplantadas contribuem para aumentar os níveis das neurotrofinas por meio de secreção direta ou por efeito parácrino, induzindo a secreção no tecido hospedeiro (Osaka et al., 2010), mas o efeito neuroprotetor dessas substâncias está

claramente associado ao benefício terapêutico da administração das células (Chen et al., 2005; Honma et al., 2006; Parr et al., 2008; Osaka et al., 2010). Entretanto, Wright et al. (2011) relataram que essas mesmas neurotrofinas podem ter efeito limitado na medula espinhal lesada frente as moléculas inibitórias presentes na cicatriz glial, ou seja, PGSC, glicoproteína associada a mielina (MAG) e Nogo-A. Nesse contexto, era esperado que a CDT, por inibir os PGSC, contribuísse para melhor ação das neurotrofinas, aumentadas pela ação das células tronco, contudo esse fato não foi comprovado. Apesar do grupo CDT+CTM ter sido o único que se diferiu do PLA e apresentou resultados semelhantes ao controle negativo em relação à sobrevivência neuronal, seu resultado foi semelhante ao do grupo que recebeu apenas as CTM.

O grupo CTM também obteve a maior expressão de VEGF. Embora esse fator trófico tenha efeito controverso na lesão medular (Wang et al., 2011) por alterar a permeabilidade da barreira hemato-espinhal e, possivelmente causar edema, na maioria das vezes ele parece ser benéfico (Patel et al., 2009). Além da sua conhecida função de estímulo aos vasos sanguíneos, ele tem ação neuroprotetora (Xin-min et al., 2005), promove crescimento axonal, melhora na recuperação funcional e aumento da sobrevivência de células tronco implantadas (Jin et al., 2011). A angiogênese por si só, já justificaria maior neuroproteção nesse grupo, pois pode ser efetiva em reduzir o dano secundário (Patel et al., 2009; Jin et al., 2011; Han et al., 2012; Kundi et al., 2013). O grupo CTM, apesar de ter expressado mais BDNF e VEGF, não apresentou melhor recuperação motora. Contrariando os achados desse estudo, Wang et al. (2011) encontraram aumento precoce na capacidade locomotora no grupo

tratado com VEGF sugerindo efeito benéfico na aceleração da recuperação neurológica. Patel et al., (2009) também constataram melhora no teste do BBB, 28 dias após o trauma, no grupo que recebeu VEGF em relação ao placebo. No trabalho de Han et al. (2012), a associação de CTM com sinvastatina aumentou a expressão de BDNF e VEGF e, foi capaz de promover redução nas cavitações da lesão e, assim como em Wang et al. (2011), com recuperação precoce da função do membro.

Em lesões da medula espinhal, a interrupção da barreira hemato-espinhal e o rompimento das redes locais de vasos sanguíneos contribuem para a inflamação e isquemia. Sendo o grau da isquemia correlacionado com a gravidade da lesão, pois a falta de vascularização impede a ocorrência de processos de reparação tecidual, terapias que contribuem para reduzir a perda de vasos e/ou restabelecer a sua integridade podem auxiliar a recuperação após uma lesão medular (McCreedy e Sakiyama-Elbert, 2012; Kundi et al., 2013). Para avaliar o efeito das terapias instituídas na angiogênese utilizouse, além do VEGF, a molécula de adesão endotélio plaquetária (PECAM-1), conhecido marcador de células do endotélio vascular (Whetstone et al., 2003; Mahoney et al., 2009). Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à expressão dessa molécula de adesão, embora o grupo CDT tenha apresentado os valores mais altos e, tenha sido observada maior vascularização nesse grupo e no CDT+CTM no exame histológico (não quantificado). Contudo, avaliou-se a expressão gênica, processo bastante precoce na angiogênese e, que pode ter ocorrido em fase anterior à avaliada nesses grupos, não sendo por isso identificada nesse estudo. Quanto a expressão gênica da caspase 3, não houve diferença entre os grupos. Esse

resultado era esperado considerando que os principais picos de apoptose ocorrem com oito e 24 horas pós trauma medular agudo experimental em ratos (Lu et al.; 2000) e, a avaliação nesse estudo foi realizada 30 dias após o trauma. Corroborando esse resultado, Lin et al. (2012) constataram níveis das caspases 3, 6, 8 e 9 significativamente maiores nos grupos que sofreram trauma medular somente até o sétimo dia pós lesão e não encontraram diferença após 14 e 28 dias, quando os níveis já estavam muito baixos em todos os grupos. Contrariando esses achados, Mallei et al. (2005) afirmaram que a apoptose pode persistir por vários meses e, Dasari et al. (2007) encontraram menor expressão de caspase-3, 21 dias após a lesão no grupo tratado com CTM.

As alterações histológicas encontradas estão de acordo com a literatura. O trauma grave geralmente causa cavitação central na medula em que apenas a borda periférica da substância branca é preservada (Tator e Fehlings, 1991). A fagocitose que se inicia poucos dias após a lesão resulta nessas cavitações (Janssens, 1991). Dependendo da gravidade da lesão, a necrose pode se estender cranial e caudalmente, tipicamente na base do funículo dorsal (Summers et al., 1995). Outro achado interessante nessa avaliação foi a distensão do canal central medular nas regiões craniais ao trauma, bem como a diminuição do seu lúmen nas regiões imediatamente caudais, fato que pode ser atribuído à obstrução do fluxo do líquido cefalorraquidiano causada pelo trauma, levando ao acúmulo desse líquido no segmento anterior a lesão e diminuição no posterior. Constatou-se ainda que o intervalo de 440 μ M entre as lâminas permitiu boa caracterização da progressão da lesão ao longo da medula espinhal, com visualização de diferentes intensidades de alterações histológicas, desde vacuolização

discreta até mielomalácia difusa intensa, no local onde foi realizado o trauma mecânico.

Quanto à avaliação imunoistoquímica pelo neuN, o grupo que recebeu a combinação de tratamentos (CDT+CTM) obteve maior número de neurônios viáveis em relação ao placebo. Os grupos que receberam células (CTM e CDT+CTM) apresentaram imunomarcção neuronal semelhante ao grupo sem trauma (CN), contudo o CDT+CTM foi o único que se diferiu do placebo. O neuN é considerado marcador específico e confiável e, tem sido extensivamente utilizado para caracterizar os neurônios (Mullen et al., 1992; Gill et al., 2005; Han et al., 2012). A maior preservação neuronal encontrada no CDT+CTM pode ter sido mediada pela neuroproteção causada pelo BDNF, NT-3 ou VEGF, embora esse grupo tenha apresentado valores desses fatores inferiores ao CTM, a avaliação foi pontual e, não mostra o comportamento dos fatores nos momentos que a precedem. Era esperado que no grupo CDT+CTM a condroitinase apresentasse efeito sinérgico com as CTM, favorecendo a cinética dessas células na lesão medular, tornando o ambiente mais propício à ação das neurotrofinas e à regeneração axonal, e, favorecendo a vascularização e seus efeitos benéficos, contudo esse fato não foi verificado, pois esse grupo teve número de neurônios viáveis semelhante ao grupo que recebeu somente as CTM. Lim et al. (2011) encontraram maior imunomarcção de neuN no grupo de ratos com isquemia cerebral que recebeu CTM e, atribuíram esse achado à migração e diferenciação das células injetadas, o que também pode ter contribuído para o resultado encontrado no grupo CDT+CTM, pois a transdiferenciação de células da medula óssea em células neuronais, embora controversa, é outro mecanismo proposto

para explicar o efeito terapêutico das CTM (Honma et al., 2006; Osaka et al., 2010; Uccelli et al., 2011).

Na análise imunistoquímica da GFAP os grupos CDT e CTM apresentaram resultados semelhantes ao CN sem, entretanto, se diferir do placebo. Quanto à avaliação da vimentina, todos os grupos com trauma apresentaram imunomarcacão maior do que o controle negativo, como era esperado. Entre os grupos com trauma, o CDT apresentou o menor valor, sendo o único que se diferiu do placebo. A vimentina e o GFAP pertencem a um grupo de proteínas designadas de filamento intermediário. O papel exato dessas duas proteínas, além de suas funções no citoesqueleto, ainda não está estabelecido, embora ambas sejam utilizadas como marcadores gliais (Oudega e Marani, 1991). A vimentina é considerada o maior componente do citoesqueleto de astrócitos imaturos, contudo Oudega e Marani (1991) demonstraram que, durante a segunda e terceira semana pós natal em ratos, ocorre transição de vimentina para GFAP, possivelmente refletindo a diferenciação de glioblastos em astrócitos. Contudo, frente a agressões ao sistema nervoso, ocorre recuperação na capacidade de expressar vimentina e, independente da causa da agressão, o reparo tecidual acaba contando com reação astrocitária em menor ou maior grau (Bondan et al., 2003), fato que foi constatado nesse estudo. Nesses dois filamentos intermediários verificou-se que a imunomarcacão é aumentada frente à injúria, em concordância, Luna et al. (2010) constataram que as células de Müller da retina de roedores, assim como os astrócitos, têm incremento de vimentina e GFAP na ocorrência de lesão, indicando estado de reatividade. Bondan et al. (2003) também verificaram maior imunomarcacão desses filamentos no tronco encefálico de

ratos submetidos ao agente gliotóxico brometo de etídio.

Embora a diminuição do GFAP nos grupos CDT e CTM não tenha sido significativa, Rodrigues Hell et al. (2009) relataram que por meio da imunomodulação, as CTM conseguem diminuir a astrogliose e a ativação microglial, com consequente redução de GFAP, contribuindo para melhorar a sobrevivência neuronal e estabilidade sináptica. A CDT pode conseguir esse efeito de maneira semelhante, pois a degradação dos PGSC pela condroitinase ABC resulta na formação do 6-sulfato dissacarídeo que também é capaz de modular a microglia acarretando neuroproteção (Rolls et al., 2008).

A cicatriz glial envolve principalmente astrócitos que são ativados na tentativa de limitar a extensão da lesão (Crespo et al., 2007; Rolls et al., 2008) e restaurar a barreira hematoencefálica (Wright et al., 2011). Essas células são os principais componentes da cicatriz glial e, expressam GFAP e vimentina, dessa forma, menor imunomarcacão da vimentina no grupo CDT é indicativo da ação dessa enzima diminuindo a cicatriz glial. Embora não tenha sido observada aumento da capacidade motora em nenhum grupo no presente trabalho, Menet et al. (2003) e Hsu et al. (2006) demonstraram que camundongos deficientes de ambos, GFAP e vimentina, ou com ablação seletiva de astrócitos reativos, mostram maior crescimento dos axônios e melhor recuperação funcional após a lesão, como resultado da redução da astrogliose reativa.

8. CONCLUSÕES

- A CDT e as CTM em terapia única ou associada não promoveram melhora motora dos animais estudados após trauma medular experimental.

- A utilização de CDT e de CTM em terapia única ou associada não modificou o padrão da lesão histológica observada nos animais em relação aos não tratados.

- A associação das CTM com a CDT promoveu neuroproteção ao apresentar viabilidade neuronal semelhante ao grupo CN, mas não demonstrou redução na cicatriz glial expressa pela imunomarcacão de GFAP e vimentina.

- As CTM, como terapia única, demonstraram ser o tratamento mais eficiente para promover aumento na expressão dos fatores tróficos BDNF e VEGF, ambos com funções reconhecidas na neuroproteção.

- O tratamento com a enzima CDT, como terapia única, aumentou a expressão da neurotrofina BDNF e promoveu queda na vimentina em relação ao placebo gerando neuroproteção e redução na cicatriz glial.

- No presente estudo os valores da expressão gênica de NT3, KDR, PECAM 1 e caspase 3 não sofreram interferência com os diferentes tratamentos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, G.; THAKOR, N. V.; ALL, A. H. Evoked potential versus behavior to detect minor insult to the spinal cord in a rat model. *J. Clin. Neurosc.*, v. 16, p. 1052-1055, 2009.

AKIYAMA, Y.; RADTKE, C.; HONMOU, O. et al. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia*, v. 39, p. 229-236, 2002.

BALARATNASINGAM, S.; JANCA, A. Brain Derived Neurotrophic Factor: a novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol. Ther.*, v. 134, p. 116-124, 2012.

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

BASSO, 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, 1996b.

BEATTIE, M.S. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *Trends Mol Med.*, v.10, p.580-583, 2004.

BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. Acute spinal cord trauma: mechanisms and

clinical syndromes. *Vet. Med.*, v. 95, p. 846-849, 2000.

BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; MELO, J. F. et al. Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Horm. Res.*, v. 72, p. 88-97, 2009.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; DAGLI, M.L.Z. Estudo da imunorreatividade astrocitária para GFAP e vimentina no tronco encefálico de ratos wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio. *Arq Neuropsiquiatr.*, v. 61, p. 642-649, 2003.

BOULENGUEZ, P.; VINAY, L. Strategies to restore motor functions after spinal cord injury. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 19, p. 587-600, 2009.

BRADBURY, E. J.; MOON, L. D. F.; POPAT, R. J. et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, v. 416, p. 636-640, 2002.

BRAUND, K.G.; SHORES, A.; BRAUNER, W.R. The etiology, pathology, and pathophysiology of acute spinal cord trauma. *Vet.Med.* v.85, p. 684-691, 1990.

BROWN, S. A.; HALL, E. D. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 200, p. 1849-1858, 1992.

BUFFO, A.; ROLANDO, C.; CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem. Pharmacol.*, v.79, p. 77-89, 2010.

- CALDEIRA, F. M. C. Células tronco mesenquimais indiferenciadas no tratamento do trauma medular espinal de ratos Lewis. 2011. 100f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária-UFMG, Belo Horizonte.
- CAMPOS, M. F.; RIBEIRO, A. T.; LISTIK, S. et al. Epidemiologia do traumatismo da coluna vertebral. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v. 35, p. 88-93, 2008.
- CARVALHO, J.L.; BRAGA, V.B.A.; MELO, M.B. et al. Priming mesenchymal stem cells boosts stem cell therapy to treat myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.*, v. 17, p. 617-625, 2013.
- CARVALHO, P. H. Avaliação neurológica e histológica de lesão compressiva da medula espinhal de ratos Wistar tratados com células tronco mesenquimais. 2011. 79f. Dissertação (Magister scientiae em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CASTANHEIRA, P.; TORQUETTI, L. T.; MAGALHÃES, D. R. S. et al. DAPI diffusion after intravitreal injection of mesenchymal stem cells in the injured retina of rats. *Cell Transplant.*, v. 18, p. 1-100, 2009.
- CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L. et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, v. 32, p. 1005-1011, 2001.
- CHEN, Q.; LONG, Y.; YUAN, X. et al. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *J. Neurosci. Res.*, v. 80, p. 611-619, 2005.
- CHO, K. J.; TRZASKA, K. A.; GRECO, S. J. et al. Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 α . *Stem Cells*, v. 23, p. 383-391, 2005.
- COLTER, S.; RUCKER, N. C. Acute injury to the central nervous system. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 18, p. 545-563, 1988.
- COSTA, P. M. Avaliação anátomo-clínica do dantroleno sódico no trauma medular agudo experimental em ratos por período prolongado. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária-UFMG, Belo Horizonte.
- COUGHLAN, A. R. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord trauma. *J. Small Anim. Pract.*, v.34, p. 117-122, 1993.
- CRESPO, D.; ASHER, R.A.; LIN, R. et al. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp. Neurol.*, v. 206, p. 159-171, 2007.
- DASARI, V. R.; SPOMAR, D. G.; CADY, C. et al. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow down regulate Caspase-3 mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. *Neurochem. Res.*, v. 32, p. 2080-2093, 2007.
- DAVIES, S. J.; FITCH, M. T.; MEMBERG, S. P. et al. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature*, v. 390, p. 680-683, 1997.
- 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.
- DRUMMOND, B. L. Subfração PnTx 3-6 do veneno da aranha armadeira (*Phoneutria nigriventer*) no tratamento de ratos wistar submetidos ao trauma agudo compressivo à medula espinhal. 2010. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária-UFMG, Belo Horizonte.
- FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, v. 279, p. 1528-1530, 1998.
- FUKUSHIMA, F.B. Avaliação do efeito neuroprotetor do propofol e do etomidato em ratos submetidos ao trauma medular espinal. 2012. 85f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária-UFMG, Belo Horizonte.
- GALTREY, C. M.; KWOK, J. C. F.; CARULLI, D. et al. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, v. 27, p. 1373-1390, 2008.
- GARCIA-ALÍAS, G.; BARKHUYSEN, S.; BUCKLE, M. et al. Chondroitinase treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat. Neurosci.*, v. 12, p. 1145-1151, 2009.
- GARCIA-ALÍAS, G.; LIN, R.; AKRIMI, S. F. et al. Therapeutic time window for the application of chondroitinase ABC after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v. 210, p. 331-338, 2008.
- GARCIA-ALÍAS, G.; PETROSYAN, H.A.; SCHNELL, L. et al. Chondroitinase abc combined with neurotrophin nt-3 secretion and nr2d expression promotes axonal plasticity and functional recovery in rats with lateral hemisection of the spinal cord. *J. Neurosci.*, v. 31, p. 17788-17799, 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, p. 1613-1623, 2006.
- GILL, S.K.; ISHAK, M.; RYLETT, R.J. Exposure of nuclear antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded necropsy human spinal cord tissue: Detection of NeuN. *J. Neurosci. Methods*, v. 148, p. 26-35, 2005.
- GRILL, R. J. User-defined variables that affect outcome in spinal cord contusion/compression models. *Exp. Neurol.*, v. 196, p. 1-5, 2005.
- GUEST, J.; BENAVIDES, F.; PADGETT, K. et al. Technical aspects of spinal cord injections for cell transplantation. clinical and translational considerations. *Brain Res. Bull.*, v. 84, p. 267-279, 2011.
- HAMBLY, P. R.; MARTIN, B. Anaesthesia for patients with chronic spinal cord injury. *Anaesthesia*, v. 53, p. 273-289, 1998.
- HAN, X.; YANG, N.; CUI, Y. et al. Simvastatin mobilizes bone marrow stromal cells migrating to injured areas and promotes functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett.*, v. 521, p. 136-141, 2012.
- HAUSMANN, O. N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 41, p. 369-378, 2003.

- HEDEMAN, L.S.; SIL, R. Studies in experimental spinal cord trauma. Part 2: comparison of treatment with steroids, low molecular weight dextran, and catecholamine blockade. *J. Neurosurg.*, v.40, p.44-51, 1974.
- HOERLEIN, B.F.; REDDING, R.W.; HOFF, E.J.; McGUIRE, J.A. Evaluation of dexamethasone, DMSO, mannitol and solcoseryl in acute spinal cord trauma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.19, p.216-226, 1983.
- HOFSTETTER, C. P.; SCHWARZ, E. J.; HESS, D. et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 99, p. 2199-2204, 2002.
- HONMA, T.; HONMOU, O.; IHHOSHI, S. et al. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Exp. Neurol.*, v. 199, p. 56-66, 2006.
- HSU, J.Y.C.; MCKEON, R.; GOUSSEV, S. et al. Matrix metalloproteinase-2 facilitates wound healing events that promote functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v. 26, p. 9841-9850, 2006.
- HUANG, W. C.; KUO, W. C.; CHERNG, J. H. et al. Chondroitinase ABC promotes axonal re-growth and behavior recovery in spinal cord injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 349, p. 963-968, 2006.
- HUANG, W. C.; KUO, W. C.; HSU, S. H. et al. Gait analysis of spinal cord injured rats after delivery of chondroitinase ABC and adult olfactory mucosa progenitor cell transplantation. *Neurosci. Lett.*, v. 472, p. 79-84, 2010.
- HU, R.; ZHOU, J.; LOU, C. et al. Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. *J. Neurosurg.Spine*, v. 13, p. 169-180, 2010.
- HWANG, D. H.; KIM, H. M.; KANG, Y. M. Combination of multifaceted strategies to maximize the therapeutic benefits of neural stem cell transplantation for spinal cord repair. *Cell Transplant.*, v. 20, p. 1361-1379, 2011.
- HYATT, A. J. T.; WANG, D.; KWOK, J. C. Controlled release of chondroitinase ABC from fibrin gel reduces the level of inhibitory glycosaminoglycan chains in lesioned spinal cord. *J Control Release*, v. 147, p. 24-29, 2010.
- IACI, J. F.; VECCHIONE, A. M.; ZIMBER, M. P. et al. Chondroitin sulfate proteoglycans in spinal cord contusion injury and the effects of chondroitinase treatment. *J. Neurotrauma*, v. 24, p. 1743-1759, 2007.
- IKEGAMI, T.; NAKAMURA, M.; YAMANE, J. et al. Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-positive fibers after rat spinal cord injury. *Eur. J. Neurosci.*, v. 22, p. 3036-3046, 2005.
- ISEDA, T.; OKUDA, T.; KANE-GOLDSMITH, N. et al. Single, high-dose intraspinal injection of chondroitinase reduces glycosaminoglycans in injured spinal cord and promotes corticospinal axonal regrowth after hemisection but not contusion. *J. Neurotrauma*, v. 25, p. 334-349, 2008.

- JANSSENS, L.A.A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. *J Small Anim Pract*, v.32, p.572-578, 1991.
- JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B. N.; LEE REINHARDT, R. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, v. 418, p.41-49, 2002.
- JIN, H.L.; PENNANT, W.A.; LEE, M.H. et al. Neural stem cells modified by a hypoxia-inducible VEGF gene expression system improve cell viability under hypoxic conditions and spinal cord injury. *SPINE*, v. 36, p. 857-864, 2011.
- JEFFERSON, S. C.; TESTER, N. J.; HOWLAND, D. R. Chondroitinase ABC promotes recovery of adaptive limb movements and enhances axonal growth caudal to a spinal hemisection. *J. Neurosci.*, v. 31, p. 5710-5720, 2011.
- JEFFERY, N.D.; BLAKEMORE, W.F. Spinal cord injury in small animals 1. Mechanisms of spontaneous recovery. *Vet. Rec.*, v.144, p.407-413, 1999.
- KAMADA, T.; KODA, M.; DEZAWA, M. et al. Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived Schwann cells reduces cystic cavity and promotes functional recovery after contusion injury of adult rat spinal cord. *Neuropathol.*, v. 31, p.48-58, 2011.
- KARIMI-ABDOLREZAEE, S.; EFTEKHARPOUR, E.; WANG, J. et al. Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. *J. Neurosci.*, v. 30, p. 1657-1676, 2010.
- KITADA, M. Mesenchymal cell populations: development of the induction systems for Schwann cells and neuronal cells and finding the unique stem cell population. *Anat Sci Int*, v. 87, p. 24-44, 2012.
- KORNEGAY, J. N. Patogênese das afecções do sistema nervosa central. In: SLATTER, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 2.ed. São Paulo: Manole, 1998. v.1, cap.71, p.1231-1249.
- KUNDI, S.; BICKNELL, R.; AHMED, Z. The role of angiogenic and wound-healing factors after spinal cord injury in mammals. *Neurosci. Res.*, v.76, p. 1-9, 2013.
- KWON, B. K.; FISHER, C. G.; DVORAK, M. F. et al. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*, v. 30, p. S3-S13, 2005.
- LEE, B. H.; LEE, K. H.; YOON, D. H. et al. Effects of methylprednisolone on the neural conduction of the motor evoked potentials in spinal cord rats. *J. Korean Med. Sci.*, v. 20, p. 132-138, 2005.
- LEE, H., MCKEON, R. J., BELLAMKONDA, R. V. Sustained delivery of thermostabilized chABC enhances axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 107, p. 3340-3345, 2010.
- LEE, K. H.; SUH-KIM, H.; CHOI, J. S. et al. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, v. 67, p. 13-22, 2007.
- LIM, J.Y.; JEONG, C.H.; JUN, J.A. et al. Therapeutic effects of human umbilical

- cordblood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res. Ther.*, v. 2, p. 1-13, 2011.
- LIN, H.S.; JI, Z.S.; ZHENG, L.H. et al. Effect of methylprednisolone on the activities of caspase 3, 6, 8 and 9 in rabbits with acute spinal cord injury. *Exp. Ther. Med.*, v.4, p. 49-54, 2012.
- LIN, R.; ROSAHL, T.W.; WHITING, P.J. et al. 6-sulphated chondroitins have a positive influence on axonal regeneration. *Plos One*, v. 6, p.1-10, July 2011.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression. Data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LU, J.; ASHWELL, K.W.S.; WAITE, P. Advances in secondary spinal cord injury: Role of apoptosis. *Spine*, v.25, p.1859-1866, 2000.
- LU, P.; JONES, L. L.; TUSZYNSKI, M. H. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v. 191, p. 344-360, 2005.
- LUNA, G.; LEWIS, G.P.; BANNA, C.D. et al. Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Mol. Vis.*, v. 16, p.2511-2523, 2010.
- MAHMOOD, A.; LU, D.; QU, C. et al. Human marrow stromal cell treatment provides long-lasting benefit after traumatic brain injury in rats. *Neurosurg.*, v. 57, p. 1026-1031, 2005.
- MAHMOOD, A.; LU, D.; LU, M. et al. Treatment of traumatic brain injury in adult rat with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurg.*, v. 53, p. 697-703, 2003.
- MAHONEY, E.T.; BENTON, R.L.; MADDIE, M.A. et al. ADAM8 is selectively upregulated in endothelial cells and is associated with angiogenesis after spinal cord injury in adult mice. *J. Comp. Neurol.*, v.512, p. 243-255, 2009.
- MALLEI, A.; ADEN, S.A.; BACHIS, A.; BRANDOLI, C.; ONGINI, E.; MOCCHETTI, I. The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. *Brain. Res.*, v.1062, p.16-25, 2005.
- MALTMAN, D. J.; HARDY, S. A.; PRZYBORSKI, S. A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem. Int.*, v. 59, p. 347-356, 2011.
- MA, M.; BASSO, M.; WALTERS, P. et al. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion Injury in the C57Bl/6 Mouse. *Exp. Neurol.*, v. 169, p. 239-254, 2001.
- MASSEY, J.M.; AMPS, J.; VIAPIANO, M.S. et al. Increased chondroitin sulfate proteoglycan expression in denervated brainstem targets following spinal cord injury creates a barrier to axonal regeneration overcome by chondroitinase ABC and neurotrophin-3. *Exp. Neurol.*, v. 209, p. 426-445, 2008.
- MCCREEDYA, D.A.; SAKIYAMA-ELBERTA, S.E. Combination therapies in

- the CNS: engineering the environment. *Neurosci. Lett.*, v. 519, p. 115-121, 2012.
- MENET, V.; PRIETO, M.; PRIVAT, A. et al. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *PNAS*, v. 100, p. 8999-9004, 2003.
- MEYER, F.; VIALLE, L. R.; VIALLE, E. N. et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirurg. Brasil.*, v. 18, p. 203-208, 2003.
- 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.
- MOCCHETTI, I.; WRATHALL, J. R. Neurotrophic factors in central nervous system trauma. *J. Neurotrauma*, v. 5, p. 853-870, 1995.
- MOORE, M.P. Approach to the patient with spinal disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 22, n. 4, p. 751-781, 1992.
- MUIR, G. D.; WEBB, A. A. Assessment of behavioural recovery following spinal cord injury in rats. *Eur. J. Neurosci.*, v. 12, p. 3079-3086, 2000.
- MULLEN R.J., BUCK C.R., SMITH A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, v. 116, p. 201-211, 1992.
- NAKAJIMA, H.; UCHIDA, K.; GUERRERO, A.R. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, v. 29, p. 1614-1625, 2012.
- NG, M.T. L.; STAMMERS, A.T.; KWON, B.K. Vascular disruption and the role of angiogenic proteins after spinal cord injury. *Transl. Stroke Res.*, v. 2, p.474-491, 2011.
- OLIVEIRA, K.M. Efeitos de diferentes doses de ω -conotoxina MVIIC no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária-UFMG, Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, M.S.; MELO, M.B.; CARVALHO, J.L. Doxorubicin cardiotoxicity and cardiac function improvement after stem cell therapy diagnosed by strain echocardiography. *J. Cancer Sci. Ther.*, v. 5, p. 52-57, 2013.
- 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.
- 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.
- OUDEGA, M. e MARANI, E. Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in the developing rat spinal cord: an immunocytochemical study of the spinal cord glial system. *J. Anat.*, v. 179, p. 97-114, 1991.

- PARR, A. M.; KULBATSKI, I.; WANG, X. H. et al. Fate of transplanted adult neural stem/progenitor cells and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the injured adult rat spinal cord and impact on functional recovery. *Surg. Neurol.*, v. 70, p. 600-607, 2008.
- PATEL, C.B.; COHEN, D.M.; AHOBILA-VAJJULA, P. et al. Effect of VEGF treatment on the blood-spinal cord barrier permeability in experimental spinal cord injury: dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J. Neurotrauma*, v. 26, p. 1005-1016, 2009.
- PAUL, C.; SAMDANI, A. F.; BETZ, R. R. et al. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine*, v. 34, p. 328-334, 2009.
- PITTINGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p. 143-147, 1999.
- QUERTAINMONT, R.; CANTINIEAUX, D.; BOTMAN, O. et al. Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions. *Plos One*, v. 7, p. 1-15, 2012.
- QUESENBERRY, P. J.; BECKER, P. S. Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 95, p. 15155-15157, 1998.
- RODRIGUES HELL, R. C.; COSTA, M. M. S.; GOES, A. M. et al. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol. Disease*, v. 33, p. 290-300, 2009.
- ROLLS, A.; SHECHTER, R.; LONDON, A. et al. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: A role in microglia/macrophage activation. *Plos Med.*, v. 5, p. 1262-1277, 2008.
- ROSSIGNOL, S.; FRIGON A. Recovery of locomotion after spinal cord injury: some facts and mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 34, p. 413-440, 2011.
- ROWLAND, J. W.; GREGORY, W. J.; HAWRYLUK, M. D. et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg. Focus*, v. 25, p. 1-17, 2008.
- RYU, H. H.; LIM, J. H.; BYEON, Y. E. et al. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J. Vet. Sci.*, v. 10, p. 273-284, 2009.
- 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.
- SEDY, J.; URDZIKOVA, L.; JENDELOVA, P. et al. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 32, p. 550-580, 2008.
- SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A.; ARIAS, M. V. B. Fisiopatologia do trauma e da compressão à medula espinal de cães e gatos. *Med. Vet.*, v. 1, p. 78-85, 2007.

- SHIELDS, L. B. E.; ZHANG, Y. P.; BURKE, M. A. Benefit of chondroitinase ABC on sensory axon regeneration in a laceration model of spinal cord injury in the rat. *Surg. Neurol.*, v. 69, p. 568-577, 2008.
- SILVA, C. M. O. Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos (*Rattus norvegicus*). 2006. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária-UFMG, Belo Horizonte.
- SILVER, J.; MILLER, J. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 5, p. 146-156, 2004.
- SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*, v. 11, p. 400-407, 2005.
- SPAETH, E.; KLOPP, A.; DEMBINSKI, J. et al. Inflammation and tumour microenvironments: Defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.*, v. 15, p. 730-738, 2008.
- SPRINGER, J.E. Apoptotic cell death following traumatic injury to the central nervous system. *J. Biochem.Mol. Biol.*, v. 35, p. 94-105, 2002.
- SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; DeLAHUNTA, A. Injuries to the central nervous system. In:____. *Veterinary Neuropathology*. St. Louis: Ed. Mosby, 1995. cap.4, p.189-207.
- SUN, F.; HE, Z. Neuronal intrinsic barriers for axon regeneration in the adult CNS. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 20, p. 510-518, 2010.
- SYKOVÁ, E; JENDELOVÁ, P. Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS. *Cell Death Differ.*, v. 14, p. 1336-1342, 2007.
- 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.
- TALAC, R.; FRIEDMAN, J. A.; MOORE, M. J. et al. Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials*, v. 25, p. 1505-1510, 2004.
- TAOKA, Y.; OKAJIMA, K. Spinal cord injury in the rat. *Prog. Neurobiol.*, v. 56, p. 341-358, 1998.
- TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.*, v. 75, p. 15-26, 1991.
- TESTER, N. J., HOWLAND, D. R. Chondroitinase ABC improves basic and skilled locomotion in spinal cord injured cats. *Exp. Neurol.*, v. 209, p. 483-496, 2008.
- THURET, S.; MOON, L. D. F.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal Cord injury. *Nature*, v. 7, p. 628-643, 2006.
- TOM, V. J.; HOULÉ, J. D. Intraspinial microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. *Exp. Neurol.*, v. 211, p. 315-319, 2008.
- TOM, V. J.; KADAKIA, R.; SANTI, L. et al. Administration of chondroitinase ABC rostral or caudal to spinal cord injury site promotes anatomical but not functional

plasticity. *J. Neurotrauma*, v. 26, p. 2323-2333, 2009.

TORRES, B. B. J. Efeitos do dantrolene sódico em ratos adultos com trauma medular agudo experimental. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária-UFMG, Belo Horizonte.

TORRES, B. B. J.; SILVA, C. M. O.; ALMEIDA, F. M. C. et al. Modelo experimental de trauma medular agudo produzido por aparelho estereotáxico modificado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 62, p. 92-99, 2010.

TROPEL, P.; NOËL, D.; PLATEL, N. et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell Res.*, v. 295, p. 395-406, 2004.

UCCELLI, A.; BENVENUTO, F.; LARONI, A. et al. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, v. 24, p. 59-64, 2011.

VAQUERO, J.; ZURITA, M. Functional recovery after severe CNS trauma: Current perspectives for cell therapy with bone marrow stromal cells. *Prog. Neurobiol.*, v. 93, p. 341-349, 2011.

VAQUERO, J.; ZURITA, M.; OYA, S. et al. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: Systemic or local administration? *Neurosci. Lett.*, v. 398, p. 129-134, 2006.

VERMEULEN, M.; LE PESTEUR, F.; GAGNERAULT, M. C. et al. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, v. 92, p. 894-900, 1998.

WALKER, A.P.; SHAH, S.K.; JIMENEZ, F. Intravenous multipotent adult progenitor cell therapy for traumatic brain injury: preserving the blood brain barrier via an interaction with splenocytes. *Exp. Neurol.*, v. 225, p. 341-352, 2010.

WANGA, Y.F.; FAN, Z.K.; CAO, Y. et al. 2-Methoxyestradiol inhibits the up-regulation of AQP4 and AQP1 expression after spinal cord injury. *Brain Res.*, v. 1370, p. 220-226, 2011.

WEBB, A. A.; NGAN, S.; FOWLER, J. D. Spinal cord injury I: A synopsis of the basic science. *Can. Vet. J.*, v. 51, p. 485-492, 2010.

WHETSTONE, W.D.; HSU, J.Y.C.; EISENBERG, M. et al. Blood-spinal cord barrier after spinal cord injury: relation to revascularization and wound healing. *J Neurosci Res.*, v.74, p. 227-239, 2003.

WRIGHT, K. T.; MASRI, W. E.; OSMAN, A. et al. Concise Review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: Mechanisms and clinical applications. *Stem Cells*, v. 29, p. 169-178, 2011.

XIA, Y.; ZHAO, T.; LI, J. Antisense vimentin cDNA combined with chondroitinase ABC reduces glial scar and cystic cavity formation following spinal cord injury in rats. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, v. 377, p. 562-566, 2008.

XIN-MIN, D.; BO-YONG, M.; SHU, J. et al. Neuroprotective effect of exogenous vascular endothelial growth factor on rat spinal cord neurons in vitro hypoxia. *Chin. Med. J.*, v. 118, p. 1644-1650, 2005.

YIU, G.; HE, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 7, p. 617-626, 2006.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F. et al. Statistical analysis of real-time PCR data. *B. M. C. Bioinformatics*, v. 7, 2006. <<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/85>>. Acesso em: 16 fev. 2012.

ZHAO, R.R. e FAWCETT, J. Combination treatment with chondroitinase ABC in spinal cord injury—breaking the barrier. *Neurosci. Bull.*, v. 29, p. 477-483, 2013.

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG)



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 145/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Chondroitinase ABC e células tronco mesenquimais, em terapia única ou associada, no tratamento de ratos submetidos a trauma da medula espinhal**", que tem como responsável(is) **Eliane Gonçalves de Melo**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 08/2011**.

Este certificado expira-se em **10/ 08/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 145/2011**, related to the project entitled "**Chondroitinase ABC and mesenchymal stem cells in single or combination therapy in the treatment of rats submitted to spinal cord injury**", under the supervisors of **Eliane Gonçalves de Melo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 10, 2011**.

This certificate expires in **August 10, 2016**.

Belo Horizonte, 12 de Agosto de 2011.

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

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

10.2. Anexo 2. Resultados individuais da capacidade motora pela escala de escores BBB em cada dia de avaliação

CONTROLE NEGATIVO								
Avaliação Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
A1G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A2G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A3G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A4G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A5G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A6G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A7G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A9G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A10G1	21	21	21	21	21	21	21	21
A2G3	21	21	21	21	21	21	21	21

PLACEBO								
Avaliação Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
A2G2	0	0	0	1	1	4	5	5
A4G2	0	0	1	5	5	0	2	6
A5G2	1	5	8	10	13	13	14	14
A6G2	0	0	0	0	1	1	1	1
A7G2	0	0	0	0	0	0	0	1
A8G2	1	1	8	8	9	9	10	10
A9G2	0	0	4	7	7	7	7	8
A10G2	0	0	1	1	1	4	4	7
A4G3	0	1	7	8	9	9	9	10
A5G3	0	0	4	4	8	8	8	9

CONDROITINASE								
Avaliação Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
A1G4	0	0	0	1	6	6	8	8
A2G4	0	0	1	1	1	1	1	1
A3G4	0	0	0	1	2	2	2	6
A4G4	1	4	8	11	13	17	19	20
A5G4	0	0	0	2	7	7	7	9
A6G4	1	1	4	8	10	12	14	14
A7G4	0	1	8	9	9	9	11	11
A8G4	0	1	8	9	9	10	10	11
A9G4	0	6	8	10	10	11	12	13
A10G4	0	0	0	0	0	1	1	1

CTM								
Avaliação Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
A1G5	0	0	1	1	7	8	8	8
A2G5	0	4	8	8	9	9	9	9
A4G5	0	0	1	1	1	3	3	3
A5G5	0	0	0	0	1	4	4	5
A7G5	0	0	0	0	1	3	3	4
A8G5	0	0	0	0	0	0	1	1
A9G5	0	0	0	0	0	1	1	1
A1G7	1	1	7	8	8	9	9	10
A5G7	0	0	0	1	6	7	7	7
A11G6	0	0	0	1	4	4	4	4

CONDROITINASE + CTM								
Avaliação Animal	1	2	3	4	5	6	7	8
A1G6	1	1	6	8	9	10	12	12
A3G6	0	0	1	4	6	7	7	7
A4G6	0	0	1	1	2	7	7	7
A5G6	0	0	0	1	1	1	4	5
A6G6	0	0	0	0	0	1	3	3
A7G6	0	0	0	0	0	0	0	0
A8G6	0	0	1	1	3	6	6	6
A9G6	0	0	0	0	1	6	7	7
A10G6	0	0	0	0	1	1	1	1
A3G7	1	1	1	2	2	2	3	8