

PABLO HERTHEL DE CARVALHO

**TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
INDUZ ALTERAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS PRÓ E
ANTINFLAMATÓRIAS E DE FATORES NEUOTRÓFICOS NO
TRATAMENTO DA LESÃO ESPINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo

Co-orientadores: Prof. Dr. Alfredo Miranda Goes
Profa. Dra. Rogéria Serakides

**Belo Hozitonte – Minas Gerais
Escola de Veterinária da UFMG
2016**

C331t Carvalho, Pablo Herthel de, 1985-
Transplante alogênico de células-tronco mesenquimais induz alteração do perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias e de fatores neurotróficos no tratamento da lesão espinal / Pablo Herthel de Carvalho. – 2016.
102 p. : il.

Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo

Co-orientadores: Alfredo Miranda Góes, Rogéria Serakides

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

Inclui bibliografia

1. Medula espinhal – Ferimentos e lesões – Tratamento – Teses. 2. Células tronco – Transplante – Teses. 3. Criopreservação – Teses. I. Melo, Eliane Gonçalves de. II. Góes, Alfredo Miranda. III. Serakides, Rogéria. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 617.482 044

FOLHA DE APROVAÇÃO

PABLO HERTHEL DE CARVALHO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 15 de Abril de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Eliane Gonçalves de Melo

Prof^ª. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador

Mário Sérgio Lima de Lavor

Prof. Mário Sérgio Lima de Lavor
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC

Natalia de Melo Ocarino

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

Juliana Lott de Carvalho

Prof^ª. Juliana Lott Carvalho
Universidade Católica de Brasília - UCB

Cléuza Maria de Faria Rezende

Prof^ª. Cléuza Maria de Faria Rezende
Escola de Veterinária - UFMG

Dawidson A. Gomes

Prof. Dawidson Assis Gomes
Instituto de Ciências Biológicas - ICB



Dedico este trabalho à toda minha família,
À minha esposa Márcia,
À minha mãe Fátima,
Ao meu irmão Carlos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais, que através da Escola de Veterinária possibilitou, durante os últimos quatro anos, formação e aprimoramento profissional, convívio intenso com a pesquisa e a rotina clínico-cirúrgica, consolidação de amizades e o desenvolvimento deste projeto.

À minha orientadora professora Eliane Gonçalves de Melo por ter me acolhido carinhosamente em sua equipe de pesquisa, pelo seu apoio, amizade, conselhos, confiança e por todos os ensinamentos em neurologia clínica e cirúrgica.

Ao meu coorientador professor Alfredo Miranda de Goes pela participação ativa na elaboração e execução do projeto, pela oportunidade de trabalhar e aprender mais sobre células-tronco e terapia celular, pela confiança ao abrir as portas do seu laboratório e grupos de pesquisa e pelo exemplo pessoal e profissional.

À minha coorientadora professora Rogéria Serakides por disponibilizar seu laboratório e orientados para auxiliar nas diferentes etapas do projeto, pela orientação sobre a necessidade de complementação dos dados com técnicas avançadas de imagem e pelo exemplo de superação e perseverança. Agradeço-lhe imensamente por todos os conselhos desde quando fui estagiário até agora, eles foram fundamentais para a escolha da minha área de atuação.

Ao professor Dawidson Assis Gomes pelos constantes e atenciosos auxílios, por disponibilizar as instalações do seu laboratório e sua equipe para auxiliar durante toda a execução do projeto.

À professora Natália de Melo Ocarino por contribuir na avaliação do projeto realizando considerações fundamentais para o aprimoramento do mesmo, pelos auxílios e pelo exemplo de competência e postura profissional.

Ao professor Márcio Flávio Dutra Moraes por permitir a utilização do Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto Ressonância e disponibilizar os seus orientados Luciana Drumond e Gustavo Henrique Souza Rezende em todas as etapas de aquisição e análise das imagens.

Agradeço ainda os mestres Cleuza Maria Faria Rezende, Geraldo Eleno Silveira Alves, Suzane Lillian Beier, Marília Martins Melo e Fabíola de Oliveira Paes Leme, por toda atenção, pelos aprendizados, pelo elevado nível técnico e exigência nas disciplinas e no cotidiano, pelos valores éticos e profissionais e por contribuírem imensamente na minha formação.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamaneto do projeto.

À minha esposa Márcia de Souza Barros Herthel por todo incentivo, compreensão, carinho e companheirismo ao longo de todos estes anos de convívio. Sua presença e participação tornaram tranquilos os momentos difíceis e espetaculares os momentos de felicidade.

À minha família pelo constante apoio, confiança e exemplos constantes de paciência e dedicação. Me dedico em refletir os bons exemplos de cada um de vocês para senti-los mais perto no meu dia-a-dia.

Aos amigos Isabel Rosado, Endrigo Gabellini, Carla Osório e Tatiana Taguchi, pela participação ativa em todas as etapas do projeto e por todo o tempo compartilhado de

aprendizado, frustrações, alegrias e vitórias. Sem vocês não seria possível a realização deste projeto.

À toda equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pela atenção e auxílio na execução das técnicas de cultivo celular e análises da caracterização das células-tronco.

À Juliana Lott Carvalho por toda sua dedicação e competência nas atividades de pesquisa, por me alavancar no conhecimento sobre células-tronco, biologia molecular e terapia celular. Seu elevado padrão me forçou a estudar cada vez mais. Agradeço a toda experiência compartilhada no laboratório, na confecção de artigos e capítulos de livros, no alçar vôos no desenvolvimentos e orientação de projetos de iniciação científica e no desenvolvimento de empresa.

Ao Juneo por toda atenção e paciência no acompanhamento das etapas de imunohistoquímica e pelo aprendizado nas horas dedicadas à leitura de lâminas.

À Ana Cláudia Chagas de Paula, Thais Maria da Mata Martins, Andrea Ferreira, Alexandra Rodrigues Pereira da Silva, Alessandra Arcoverde Cavalcanti Zonar por todo o convívio e aprendizado no laboratório e pelo acolhimento nas suas pesquisas e áreas de atuação.

Aos colegas Paula Costa, Maria Paula, Bernardo Martins e Karen Maciel da equipe de neurologia e à Paula Milani da anestesiologia.

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

Aos animais experimentais, que involuntariamente cederem a vida para realização desse estudo.

À Deus, que me permitiu conhecer todas estas pessoas e compartilhar momentos de aprendizado, felicidade e superação.

O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las.
Mario Sergio Cortella

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	11
	LISTA DE FIGURAS	11
	LISTA DE ABREVIATURAS	16
	RESUMO	19
	ABSTRACT	20
1.	INTRODUÇÃO GERAL	21
2.	HIPÓTESE	23
2.1.	HIPÓTESE GERAL	23
2.2.	HIPÓTESES PARTICULARES	23
3.	OBJETIVOS	23
3.1.	OBJETIVO GERAL	23
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4.	CAPÍTULO I – Modelos experimentais e terapias aplicadas na lesão espinal aguda – Revisão de literatura	24
4.1.	FISIOPATOLOGIA DA LESÃO ESPINAL AGUDA	24
4.2.	MODELOS EXPERIMENTAIS	25
4.3.	TERAPIAS VIGENTES E EM PESQUISA	27
4.3.1.	Terapia com imunomoduladores	27
4.3.2.	Terapia com inibidores e antagonistas de canais iônicos e receptores de glutamato	28
4.3.3.	Terapia celular	29
5.	CAPÍTULO II - Criopreservação de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	32
5.1.	INTRODUÇÃO	32
5.2.	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.2.1.	Animais	33
5.2.2.	Coleta, cultivo e expansão de CTM do tecido adiposo	33
5.2.3.	Grupos experimentais	34
5.2.4.	Caracterização das CTM	35
5.2.4a.	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	35
5.2.4b.	Diferenciação <i>in vitro</i>	35
5.2.5.	Criopreservação das CTM	36
5.2.6.	Descongelamento das CTM	37
5.2.7.	Testes de viabilidade celular	37
5.2.8.	Análise estatística	37
5.3.	RESULTADOS	37
5.3.1.	Coleta, cultivo e expansão de CTM do tecido adiposo	37
5.3.2.	Caracterização das CTM	38
5.3.3.	Criopreservação, descongelamento e viabilidade das CTM	41
5.4.	DISCUSSÃO	43
5.5.	CONCLUSÕES	45
6.	CAPÍTULO III - Efeitos imunomodulatórios e neuroprotetor de dois protocolos de tratamento com células-tronco mesenquimais criopreservadas em ratos com lesão espinal aguda	46
6.1.	INTRODUÇÃO	46
6.2.	MATERIAL E MÉTODOS	47
6.2.1.	Animais	47

6.2.2.	Grupos experimentais e delineamento experimental	48
6.2.3.	Células-tronco mesenquimais criopreservadas e transplante celular	48
6.2.4.	Protocolo anestésico e procedimento cirúrgico	49
6.2.5.	Avaliação neurológica	50
6.2.6.	Obtenção de imagens por ressonância magnética	50
6.2.7.	Eutanásia	51
6.2.8.	Avaliação anatomohistopatológica e imunohistoquímica	51
6.2.9.	Avaliação da expressão relativa das citocinas e fatores neurotróficos	52
6.2.10.	Análise estatística	54
6.3.	RESULTADOS	54
6.3.1.	Células-tronco mesenquimais criopreservadas e transplante celular.....	54
6.3.2.	Protocolo anestésico e procedimento cirúrgico	55
6.3.3.	Avaliação neurológica	55
6.3.4.	Obtenção de imagens por ressonância magnética	57
6.3.5.	Avaliação anatomohistopatológica	58
6.3.6.	Avaliação imunohistoquímica	60
6.3.7.	Avaliação da expressão relativa das citocinas e fatores neurotróficos	66
6.4.	DISCUSSÃO	69
6.5.	CONCLUSÕES	78
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
9.	ANEXOS	100
9.1.	Anexo I - Protocolo do CETEA	100
9.2.	Anexo II – Escala proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (1996) para avaliação da capacidade motora de ratos e classificação por escores	101

LISTA DE TABELAS

Capítulo I**Revisão de literatura**

Tabela 1.	Principais modelos experimentais de lesão da medula espinal de acordo com o mecanismo indutor da lesão primária.....	26
-----------	--	----

Capítulo II**Criopreservação de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo**

Tabela 1.	Médias e desvio padrão da expressão imunofenotípica das CTM previamente ao congelamento.....	38
-----------	--	----

Capítulo III**Efeitos imunomodulatórios e neuroprotetor de dois protocolos de tratamento com células-tronco mesenquimais criopreservadas em ratos com lesão espinal aguda.**

Tabela 1.	Lista de genes com a respectiva sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR em tempo real.....	53
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II**Criopreservação de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo**

Figura 1.	Fotomicrografia de contraste de fase das células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo de ratos GFP. (A) Células com aspecto fibroblastóides, aderidas à superfície de cultivo e distribuídas em toda extensão das garrafas de cultura. Notar presença de células arredondadas. (B) Maior aumento das células fibroblastóides com evidência do núcleo e prolongamentos citoplasmáticos responsáveis pela adesão celular. (C) Menor aumento de uma cultura em quarta passagem demonstrando confluência das células acima de 80%. Barra = 100 µm.....	38
Figura 2.	Histogramas da expressão de CD 11b, CD34, CD45, CD54, CD73, CD90, MHC-I e MHC-II por citometria de fluxo em CTM obtidas do tecido adiposo após a quarta passagem. (A) Representa a população selecionada para análise - R1 - no gráfico de tamanho versus granulosidade. (B-J) Os histogramas apresentam o número de eventos versus intensidade de fluorescência. A curva preenchida é o controle negativo da fluorescência e a curva branca, representa a população de células avaliadas para um marcador específico, considerada positiva acima de 10 ¹	39
Figura 3.	Representação gráfica da expressão de CD 11b, CD34, CD45, CD54, CD73, CD90, MHC-I e MHC-II das células-tronco mesenquimais em amostras previamente ao congelamento (pré), criopreservadas no meio A, meio B e meio C após diferentes tempos de congelamento (30, 60 e 90 dias).....	39
Figura 4.	Fotomicrografia das culturas de CTM submetidas à diferenciação osteogênica (D e G), condrogênica (E e H) e adipogênica (F e I), previamente ao congelamento e após 90 dias de congelamento no meio	

	A. Os controles negativos de cada diferenciação (A-C), realizados com os meios de cultura sem a suplementação específica são evidenciam ausência de diferenciação para comparação. Barra = 250µm.....	40
Figura 5.	Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células viáveis no teste de Azul de Tripán nos tempos pré congelamento, 30, 60 e 90 dias. Os três meios de criopreservação foram analisados entre si nos diferentes tempos *P<0,01 e **P<0,001 quando comparados aos meios de criopreservação (ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni).....	41
Figura 6.	Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células viáveis no teste de Azul de Tripán demonstrando as diferenças encontradas dentro do mesmo grupo (meio de criopreservação). *P<0,01 e **P<0,001 quando comparados aos meios de criopreservação (ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni).....	42
Figura 7.	Viabilidade das CTM avaliada pelo ensaio de MTT nos diferentes meios de criopreservação. Visualização de cristais de formazan produzidos pelas CTM cultivadas previamente ao congelamento (A), 30 dias (B), 60 dias (C) e 90 dias após o congelamento no meio de criopreservação C. E) Representação gráfica da viabilidade celular das culturas previamente ao congelamento e 48 horas após o descongelamento nos diferentes grupos. F) Representação gráfica comparativa da viabilidade celular entre os meios nos diferentes tempos. *P<0,05, quando comparados ao tempo pré-congelamento (ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni). Barra = 200µm.....	43
<hr/>		
Capítulo III	Efeitos imunomodulatórios e neuroprotetor de dois protocolos de tratamento com células-tronco mesenquimais criopreservadas em ratos com lesão espinal aguda	
Figura 1.	Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células viáveis no teste de Azul de Tripán entre os tempos de análise. O teste foi realizado logo após o preparo das doses para transplante (0 horas) e três horas após o preparo. *P<0,015.....	54
Figura 2.	Representação gráfica da avaliação neurológica através da escala de escores da função motora proposta por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) durante os 21 dias de avaliação. Foi observada diferença significativa entre os grupos tratados (Kruskal Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's) sendo representada por (*) quando GI difere de GC (p<0,05), (**) quando GII difere de GC (p<0,05) e (***) quando GII difere de GI (p<0,05). As diferenças com o grupo sham não foram representadas no gráfico.....	56
Figura 3.	Imagens ponderadas em T1 obtidas por ressonância magnética da medula espinal de ratos Wistar no 21º dia após o trauma espinal. Secção transversal da medula espinal de animal do grupo GS, sem lesão no tecido nervoso (A). B) Ssecção transversal da medula espinal de animais	

- com lesão circunscrita de hiposinal (seta) na região dorsal do tecido nervoso do grupo GC e dos grupos GI (C) e GII (D)..... 57
- Figura 4. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos Wistar do grupo sham (GS) oito dias após a laminectomia utilizada para acesso ao canal vertebral: A) Medula espinal de animal submetido à laminectomia na qual observa-se a arquitetura do tecido nervoso preservada com substância cinzenta em nítido “H” medular e substância branca na periferia, meninges íntegras (cabeças de setas pretas), canal epidurário (círculo), sulco intermédio dorsal (setas pretas), fissura mediana ventral (seta pontilhada), artéria espinal ventral (seta vermelha) e raízes nervosas dorsais e ventrais (asteriscos). A substância branca está íntegra em todos os funículos; B) Neurônios íntegros com substância de Nissl (seta), núcleos e nucléolos evidentes (cabeças de setas), células da glia (círculos). Coloração HE; A: Barra = 285 µm; B: Barra = 35 µm..... 58
- Figura 5. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos Wistar dos grupos controle (GC), tratado com uma aplicação (GI) e tratado com duas aplicações (GII), oito dias após a lesão compressiva da medula espinal: A, D e G) Cortes provenientes das regiões craniais da medula espinal de animais dos grupos GC, GI e GII, respectivamente. Nota-se malácia focalmente extensa acometendo o funículo dorsal, extendendo-se ventralmente na comissura cinzenta e lateralmente nos cornos dorsais; discreta degeneração axonal e tumefação de mielina acometendo os funículos dorsais e laterais. B, E e H) Corte proveniente da região de epicentro de medula espinal de animais dos grupos GC, GI e GII, respectivamente. Malácia acometendo toda substância branca e cinzenta. C, F e I) Cortes provenientes das regiões craniais da medula espinal de animais dos grupos GC, GI e GII, respectivamente. Observa-se área de malácia focalmente extensa no funículo dorsal e discreta degeneração axonal e tumefação de mielina acometendo os funículos dorsais e laterais. Coloração HE. Barra = 285 µm. 59
- Figura 6. Fotomicroscopias de cortes histológicos dos segmentos caudais ao epicentro de medulas espinhais de ratos Wistar dos grupos controle (GC), tratado com uma aplicação (GI) e tratado com duas aplicações (GII). A, D e G) Cortes provenientes do funículo dorsal contendo área de cavitação. Notar a diferença do infiltrado celular na região da cavitação, composto predominantemente por células pequenas, citoplasma escasso, denso e poucas ramificações (A) e por células com citoplasma volumoso, vacuolizado e com ramificações (D e G). B, E e H) Corte proveniente da região do funículo lateral representando as lesões na substância branca, caracterizadas por moderada degeneração axonal e da bainha de mielina (setas). C, F e I) Cortes da substância cinzenta dos cornos ventrais evidenciando neurônios degenerados, com perda da substância de Nissl e núcleo deslocado para periferia (cabeças de setas). a Coloração HE. A, D e G: Barra = 100µm; B, C, E, F, H e I: Barra = 35 µm..... 60
- Figura 7. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos

	Wistar 21 dias após trauma espinal, avaliadas com anticorpo anti-eGFP. (A) Marcação negativa pelo anticorpo no grupo controle. (B e C) Marcação positiva (setas) de células pelo anticorpo anti-eGFP no grupo tratado com uma aplicação de CTMs (B) e duas aplicações (C). Estreptavidina-biotina-peroxidase contra-corado com hematoxilina de Harris. Barra = 23µm.....	61
Figura 8.	Fotomicroscopias de cortes histológicos da região caudal ao epicentro de medulas espinhais de ratos Wistar 8 dias após laminectomia e trauma espinal. Secções processadas pela técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-CD68, com estreptavidina-biotina-peroxidase e contra-corados com hematoxilina de Harris. Marcação pouco visível ou ausente foi observada apenas nos cortes das medulas dos animais do grupo sham (A e B). A marcação foi intensa na região da malácia localizada no funículo dorsal dos grupos controle (C e D), tratados com uma aplicação de CTM (E e F) e tratados com duas aplicações de CTM (G e G). Observou-se predomínio de células de menor volume citoplasmático e citoplasma mais denso no funículo dorsal do grupo controle (D), e células com citoplasma volumoso e menos denso nos grupos tratados com células (F e H). A, C, E e G: barra = 285µm; B, D, F e H: barra = 35µm.....	62
Figura 9.	Intensidade de expressão em pixels de CD68 nos animais dos grupos sham (GS), controle (GC), tratados com uma dose de CTM (GI) e duas doses de CTM (GII). Representação das médias e desvio padrão da marcação com anti-CD68 na substância branca (A), substância cinzenta (B) e no funículo dorsal (C) nos tempos de 8 e 21 dias após laminectomia e indução da lesão. *p<0,05.....	63
Figura 10.	Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos Wistar 21 dias após laminectomia e trauma espinal. Secções processadas pela técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-NeuN, com estreptavidina-biotina-peroxidase e contra-corados com hematoxilina de Harris. Marcação mais intensa nos cornos dorsal e ventral de animais do grupo sham (A e B) e nos grupos tratados com uma aplicação de CTM (E e F) e duas aplicações de CTM (G e H) do que no grupo controle (C e D). Há presença de neurônios não marcados (setas) em todos os grupos submetidos à lesão, sobretudo no corno ventral. Barra = 35µm.....	64
Figura 11.	Intensidade de expressão em pixels de NeuN nos animais dos grupos sham (GS), controle (GC), tratados com uma dose de CTM (GI) e duas doses de CTM (GII). Representação das médias e desvio padrão da marcação com anti-NeuN na substância cinzenta nos tempos de 8 e 21 dias após laminectomia e indução da lesão espinal. *p<0,05.....	65
Figura 12.	Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos Wistar 21 dias após laminectomia e trauma espinal. Secções processadas pela técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP, com	

estreptavidina-biotina-peroxidase e contra-corados com hematoxilina de Harris. Marcação distribuída na substância branca e cinzenta de forma não uniforme nos grupos GS (A,B e C), GC (D, E e F), GI (G, H e I) e GII (J, L, M). No funículo dorsal, nota-se marcação de prolongamentos no grupo controle (E) e pouca ou nenhuma marcação nos grupos tratados com CTM (H e L). A, D, G e J: barra = 285 μ m; B, C, E, F, H, I, J e M: barra = 35 μ m..... 66

Figura 13. Intensidade de expressão em pixels de GFAP nos animais dos grupos sham (GS), controle (GC), tratados com uma dose de CTM (GI) e duas doses de CTM (GII). Representação das médias e desvio padrão da marcação com anti-GFAP na substância branca (A), substância cinzenta (B) e no funículo dorsal (C) nos tempos de 8 e 21 dias após laminectomia e indução da lesão. *p<0,05..... 67

Figura 14. Efeito do tratamento com CTM sobre a expressão gênica relativa das citocinas após trauma espinal em ratos. Representação gráfica da quantificação relativa (média e desvio padrão) do transcrito gênico para IL-10 (A), TNF- α (B) e IL-1 β (C) pela técnica de RT-qPCR nos animais do grupo shan (GS), controle (GC), tratados com uma aplicação de CTM (GI) e tratados com duas aplicações de CTM (GII), avaliados às 24, 48, 72 horas, oito e 21 dias após trauma espinal. *p<0,05..... 68

Figura 15. Efeito do tratamento com CTM sobre a expressão gênica relativa dos fatores neurotróficos após trauma espinal em ratos. Representação gráfica da quantificação relativa (média e desvio padrão) do transcrito gênico para TGF- β (A), BDNF (B), GDNF (C) e VEGF (D) pela técnica de RT-qPCR nos animais do grupo shan (GS), controle (GC), tratados com uma aplicação de CTM (GI) e tratados com duas aplicações de CTM (GII), avaliados às 24, 48, 72 horas e oito e 21 dias após trauma espinal. *p<0,05..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Mi
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
AINEs	Antinflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
BBB	Basso, Beattie e Bresnahan
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CeBio	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFU-F	Células formadoras de colônias fibroblásticas (<i>colony forming units-fibroblastic</i>)
cm	Centímetro
CO ₂	Gás carbônico
COX-2	Cicloxigenase do tipo 2
CT	Célula-tronco
CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTM-AD	Célula-tronco mesenquimal do tecido adiposo
CTPMAG	Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto Ressonância
CTS	Célula-tronco somática
d	Dia
DAB	3-3' diaminobenzina peroxidase
DCCV	Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eGFP ^{+/+}	Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
EV	Escola de Veterinária
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Gauge
g	Grama
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GC	Grupo controle
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia (<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>)
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GI	Grupo tratado I
GII	Grupo tratado II
GS	Grupo sham

h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
IV	Intravenosa
Kg	Kilograma
L	Litro
LCE	Líquido cerebrospinal
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LICM	Laboratório de Imunologia Celular e Molecular
M	Molar
MASCIS	<i>Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study</i>
mg	Miligrama
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milimetro
MO	Medula óssea
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
N	Número amostral
NaCl	Cloreto de sódio
NASCIS	<i>National Acute Spinal Cord Injury Studies</i>
NGF	Fator de crescimento de nervo (<i>nerve growth factor</i>)
nm	Nanometro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NNC	Núcleo de Neurociências
°C	Graus Célsius
ON	Óxido nítrico
OSU	<i>Ohio State University</i>
PBS	Solução tampão de fosfato padrão
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PSA	Solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina B
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa em tempo real
RyR	Receptor de canal de cálcio do tipo rianodina
SC	Subcutâneo
SFB	Soro fetal bovino
SHAM	Controle negativo

SNC	Sistema nervoso central
RM	Ressonância magnética
TGF- β	Fator de transformação do crescimento (<i>Transforming growth factor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factors alpha</i>)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>vascular endothelial cell growth factor</i>)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar dois protocolos de tratamento da lesão espinal aguda com células-tronco mesenquimais criopreservadas, extraídas do tecido adiposo (CTM-AD) de ratos Lewis eGFP. Avaliou-se a expressão de marcadores de superfície, capacidade de diferenciação e viabilidade celular pré e pós criopreservação de CTM-AD submetidas à três meios de criopreservação com concentrações distintas de soro fetal bovino (SFB). Os resultados demonstraram que as CTM-AD não perdem sua multipotência, não modificam a expressão fenotípica e apresentam alta viabilidade celular por até 90 dias de criopreservação. Avaliou-se também os efeitos imunomodulatórios e neuroprotetores do tratamento único (grupo GI) e duplo (grupo GII) com CTM-AD alogênicas criopreservadas por via intravenosa após lesão espinal. Os grupos tratados (GI e GII) foram avaliados conjuntamente com o grupo sham (GS) e controle negativo (GC) através da escala de função motora (BBB), expressão dos transcriptos gênicos de interleucina-10 (IL-10), interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de transformação do crescimento (TGF- β), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neutrófico derivado da glia (GDNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Adicionalmente realizou-se quantificação por imunohistoquímica do infiltrado inflamatório (anti-CD68), integridade neuronal (anti-NeuN), e ativação de astrócitos (anti-GFAP). Quando comparado ao grupo GC, os grupos tratados com CTM apresentaram maiores escores nas avaliações funcionais a partir de 72h após lesão, sendo a média dos maiores escores alcançada pelo grupo GII; menor expressão de CD68 e GFAP juntamente com a redução da degeneração da substância branca e maior expressão de NeuN. O tratamento com as células também resultou em aumento da expressão de IL-10, GDNF, VEGF e redução da expressão de TNF- α e TGF- β . Adicionalmente o grupo GII apresentou redução da expressão de IL-1 β e aumento da expressão de BDNF. Conclui-se que o tratamento alogênico com duas aplicações de CTM-AD criopreservadas promove melhor recuperação da atividade motora, reduz o infiltrado inflamatório, ativa células da micróglia/macrófagos com fenótipo antiinflamatório, aumenta a quantidade de neurônios íntegros, reduz a degeneração da substância branca e a ativação de astrócitos na medula espinal e aumenta a secreção do fator neurotrófico BDNF.

Palavras-Chave: terapia celular; lesão espinal compressiva; neuroproteção; imunomodulação.

ABSTRACT

This thesis aimed to compare two treatment protocols with cryopreserved allogenic adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC) after spinal cord injury. Experiment 1 evaluated pre-freeze and pos-freeze populations of AD-MSCs response to freezing at 30, 60 and 90 days following cryopreservation. Plasticity, cell surface phenotype and cell viability were evaluated at different times after thawing technique. Results showed that MSC do not lose their multipotency, do not alter phenotypic profile and have a high cell viability for up to 90 days of cryopreservation. Experiment 2 evaluated the immunomodulatory and neuroprotective effects of cryopreserved allogenic adipose-derived MSCs after spinal cord injury (SCI). Treatment effects were comparatively evaluated by quantitation of gene expression of interleukin-10 (IL-10), interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF- α), transforming growth factor (TGF- β), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial derived neurotrophic factor (GDNF) and vascular endothelial growth factor (VEGF). Immunohistochemical analyzes were used to quantify inflammatory infiltrate (anti-CD68), neural integrity (anti-NeuN), and astrocytes activation (anti-GFAP). Frozen adipose-derived MSCs were transplanted after three hours (GI) and three hours and seven days after SCI (GII). The results were compared with animals without SCI (GS) and SCI without treatment (GC). MSCs treated groups had higher scores in functional assessments from 72h after injury, being the average of the highest scores achieved by the GII; lower expression of CD68 and GFAP along with reducing of degeneration of the white matter and increased expression of NeuN. The treatment with the cells also resulted in increased IL-10 expression, GDNF, VEGF and reduced of TNF- α and TGF- β expression. Additionally the GII decreased IL-1 β expression and increased BDNF expression. The results suggest that early intravenous injection of AD-MSCs after acute SCI promotes better recovery of function, prevent futher damage through enhancement of anti-inflammatory mechanisms, reduces the inflammatory infiltrate, active anti-inflammatory phenotype of microglia, increase neuron viability, reduces the degeneration of the white matter and astrocyte activation in SCI. In addition, treatment with double applications of AD-MSCs was superior to the single administration of these cells, resulting in improved motor response and secretion of BDNF.

Key-words: cell therapy; spinal cord injury; neuroprotection; immunomodulation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Lesão espinal é definida como afecção do tecido nervoso presente na medula espinal, que pode ocorrer devido à compressão, concussão, secção ou laceração, e a isquemia tecidual (Tator e Fehling, 1991; Bergman et al., 2000b). Diferentes etiologias podem resultar em danos ao tecido nervoso, sendo comum a separação em dois grandes grupos etiológicos: causas intrínsecas e extrínsecas (Olby, 1999). As causas intrínsecas abrangem as extrusões ou protrusão dos discos intervertebrais, embolismo fibrocartilaginoso, fraturas, luxações e subluxações secundárias à doenças metabólicas, nutricionais, má-formação e neoplasias (Olby, 1999; Bergman et al., 2000b). Fraturas, luxações e subluxações vertebrais secundárias à eventos traumáticos como atropelamentos, quedas e lesões por arma de fogo são as principais causas extrínsecas (Olby, 1999; Zotti et al., 2011).

Na medicina humana, a lesão espinal registra 12.500 casos por ano nos Estados Unidos, havendo uma prevalência de 276.000 casos no mesmo país, o que gera um custo de US\$ 9,5 milhões por ano com cuidados médicos (NSCISC, 2015). Estima-se que dois milhões e meio de pessoas convivam com lesão da medula e que mais de 130 mil novos casos ocorram anualmente no mundo (Thuret et al., 2006; Hu et al., 2010a). No Brasil, anualmente ocorrem mais de 10.000 novos casos de lesão espinal, sendo o trauma a causa predominante (Campos et al., 2008). Em animais, não há dados sobre a incidência, provavelmente porque muitos dos pacientes acometidos são submetidos a eutanásia (Arias et al., 2007). No entanto, a lesão espinal representa a segunda causa mais comum de atendimento no setor de neurologia veterinária (Zotti et al., 2011).

A lesão espinal (ou medular) acarreta redução ou perda da função motora, sensitiva e alterações viscerais autonômicas importante, devido a danos no tecido nervoso e em seus elementos (Blight, 2000). Dois eventos se somam na lesão espinal: a lesão primária, promovida pelo dano mecânico sobre o tecido e a lesão secundária, que corresponde à uma série de eventos bioquímicos e celulares que resultam no aumento do dano tecidual inicial. A lesão primária promove interrupção direta das vias neuronais e é progressivamente aumentada pela lesão secundária, em um período de horas até dias, agravando e exacerbando a lesão inicial (Tator e Fehling, 1991; Bergman et al., 2000b). Os eventos secundários se caracterizam por um processo inflamatório que reduz a recuperação funcional pelo desenvolvimento do tecido cicatricial na medula, bem como por levar à necrose ou apoptose de neurônios e células da glia, sobretudo oligodendrócitos (Hausmann, 2003). A ativação e modulação do processo inflamatório após a lesão medular resulta da combinação de mecanismos como a quebra da barreira hematoencefálica (Schnell et al., 1999a; Schnell et al., 1999b), hemorragia e hipóxia/isquemia tecidual, excitotoxicidade, formação de radicais livres e consequente peroxidação lipídica, liberação de proteases, invasão leucocitária, ativação da microglia, apoptose neuronal e de células da glia (Hausmann, 2003). O tratamento da lesão medular espinal é um desafio para a medicina humana e veterinária e deve ser considerado de emergência, visto que a decisão rápida e adequada aumenta as chances de recuperação funcional (Arias et al., 2007). Os recursos terapêuticos disponíveis visam reduzir ou interromper os eventos secundários ao trauma inicial, sobretudo inflamatórios, podendo influenciar na sobrevivência neuronal e recuperação neurológica (Braund et al., 1990; Bergman et al., 2000a). Contudo, nenhum recurso cirúrgico ou farmacológico disponível na prática clínica é capaz de reverter totalmente os danos neurológicos após a lesão espinal (Bergman et al., 2000a; Kube e Olby, 2008).

Terapias celulares constituem a estratégia terapêutica mais estudada nos últimos 10 anos devido à expectativa de que as células transplantadas possam substituir o tecido danificado, promover a regeneração axonal, ou desempenhar um papel neuroprotetor (Olby, 2010). A terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) tem sido considerada uma opção promissora, com bons resultados relacionados à neuroproteção em modelos animais de doença de Huntington (Moraes et al., 2012), Alzheimer (Lee et al., 2010), Parkinson (Yang et al., 2013), esclerose lateral amiotrófica (Karussis et al., 2008), isquemia cerebral (Honma et al., 2006) e lesão espinal (Takeuchi et al., 2007; Osaka et al., 2010; Carvalho, 2011; Silva 2013).

Acredita-se que a substituição de células neurais pelas CTM não seja a principal contribuição, mas sim a modulação da resposta inflamatória e a ação de fatores de crescimento, que podem estimular as células-tronco neurais a promover a regeneração, além de reduzir a apoptose de neurônios e células da glia (Jeffery et al., 2001; Sanchez-Ramos, 2002; Mezey et al., 2003; Ankeny et al., 2004; Dasari et al., 2007; Ide et al., 2010). Dentre os fatores de crescimento produzidos pelas CTM, destacam-se o fator de crescimento de nervo (*nerve growth factor* - NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* - BDNF), e o fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial cell growth factor* - VEGF) (Majunder et al., 1998; Mahmood et al., 2002). Além desses fatores, as CTM produzem citocinas pró e anti-inflamatórias, como as interleucinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α), que podem modular a reação inflamatória desencadeada pelo trauma de medula espinal (Deans e Moseley, 2000; Monteiro et al., 2008), incrementar a recuperação funcional e diminuir a expansão da lesão do tecido nervoso característica da fase secundária da lesão (Majunder et al., 1998; Wang et al., 2002; Ankeny et al., 2004; Ide et al., 2010; Carvalho, 2011).

Por meio da modulação da resposta imune e da secreção de neurotrofinas e fatores neuroprotetores, as CTM podem reduzir as perdas neuronal e glial (Dasari et al., 2007). Quatro horas após a lesão espinal, grande número de células neuronais e gliais apoptóticas já podem ser observadas, sendo o pico de apoptose neuronal com oito horas e glial com 24 horas. Sete dias após a lesão, observa-se o segundo pico de apoptose (Liu et al., 1997), e 30 dias após observam-se áreas de cavitação, e cicatriz glial formada por astrócitos (Beattie et al., 1998), que constitui uma barreira física para a regeneração axonal (Bradbury e Carter, 2011). Devido ao caráter progressivo da lesão espinal desencadeado pelos eventos secundários, os quais se iniciam imediatamente após a lesão, acredita-se que o transplante de CTM em curto período após a lesão seja uma estratégia terapêutica eficiente (Nandoe Tewarie et al. 2009). Entretanto, o tempo necessário para obtenção e proliferação de CTM autógenas não permite aplicação nas primeiras horas após o trauma (Dasari et al., 2007). A criação de um banco de células-tronco alógenas congeladas viabilizaria esta opção terapêutica na fase aguda da lesão, permitindo a obtenção de melhores resultados (Balci e Can, 2013).

O objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito imunomodulatório e neuroprotetor das CTM-AD criopreservadas e os mecanismos responsáveis por estes efeitos em animais após o trauma espinal agudo.

2. HIPÓTESE

2.1. Hipótese geral

O transplante intravenoso de CTM alógenas criopresevadas, obtidas do tecido adiposo, promove neuroproteção, plasticidade neuronal e consequente recuperação funcional em modelo animal de lesão espinal compressiva.

2.2. Hipóteses particulares

1. As CTM promovem modulação do processo inflamatórios, por ação parácrina, reduzindo a ativação de astrócitos e micróglia, reduzindo o infiltrado inflamatório e criando um ambiente favorável à sobrevivência neuronal e redução da cicatriz glial.
2. As CTM promovem neuroproteção por meio da secreção de fatores tróficos, reparação do tecido nervoso e recuperação funcional.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta clínica, os efeitos neuroprotetores e imunomodulatórios do tratamento com aplicação alogênica de células-tronco mesenquimais criopreservadas, obtidas do tecido adiposo de ratos Lewis transgênicos para a proteína verde fluorescente (eGFP+/+), em duas janelas terapêuticas (três horas e sete dias) após lesão compressiva de medula espinal em modelo animal.

3.2. Objetivos específicos

1. Isolar, cultivar e caracterizar as CTM derivadas do tecido adiposo de ratos Lewis eGFP+/+;
2. Avaliar a viabilidade das CTM após congelamento com três meios de criopreservação e caracterizar as CTM após descongelamento com o meio de criopreservação que obtiver maior viabilidade celular;
3. Avaliar e comparar o efeito do tratamento com uma e duas administrações intravenosas de CTM após criopreservação, na recuperação da função motora pelo teste de BBB;
4. Avaliar as alterações morfológicas da medula espinal por meio de análises histopatológicas em animais tratados com uma e duas administrações intravenosas de CTM;
5. Quantificar por meio de avaliação imunohistoquímica os neurônios (anti-NeuN), o infiltrado inflamatório (anti-CD68) e os astrócitos (anti-GFAP) na medula espinal após lesão compressiva, nos diferentes grupos;
6. Avaliar a expressão gênica da citocinas interleucina-10 (IL-10), interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neutrófico derivado da glia (GDNF), fator de transformação do crescimento (TGF- β) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na medula espinal nos diferentes grupos.

CAPÍTULO I

Modelos experimentais e terapias aplicadas na lesão espinal aguda – Revisão de literatura

1. Fisiopatologia da lesão espinal aguda

Lesão espinal, trauma medular, trauma medular espinal ou trauma raquimedular são sinônimos de uma afecção do tecido nervoso localizada na medula espinal (ou espinhal) que ocorre de forma súbita gerando dano inicial. A lesão primária resulta do dano mecânico direto que pode ocorrer por compressão, contusão, secção, laceração, ou tração do tecido nervoso (Bergman et al., 2000b). Podem coexistir mais de um fator que causará o dano mecânico (Tator e Fehling, 1991; Bergman et al., 2000b). O dano inicial caracteriza-se pela ruptura física das membranas celulares, causando morte celular, hemorragia e consequente isquemia, lesões neuronais e gliais generalizadas (Rowland et al., 2008). Associado ao evento inicial, ocorre ruptura da barreira hematoencefálica (ou hematomedular), promovendo infiltração leucocitária no parênquima, principalmente de neutrófilos, e ativação da cascata do complemento, gerando edema (Saville et al., 2004).

Após a lesão primária ocorre hemorragia, edema, necrose axonal, morte neuronal e desmielinização, seguidos por formação cística no interior da medula, que originará a cicatriz glial (Lecouter, 1998; Olby, 1999; Rowland et al., 2008).

A hemorragia inicia-se na substância cinzenta, atinge a substância branca periférica e progride cranial e caudalmente ao foco inicial (Hagg e Oudega, 2006). A substância cinzenta evolui em menos de uma hora para necrose hemorrágica devido à baixa resistência dos neurônios a hipóxia e sua elevada taxa metabólica. As lesões na substância cinzenta são consideradas irreversíveis, uma vez que cursam com morte neuronal. A substância branca apresenta menor sensibilidade à hipóxia devido aos seus componentes celulares (oligodendrócitos), suportando maior período de hipóxia hemorrágica (Tator e Fehling, 1991).

O aporte inadequado de energia e oxigênio para os neurônios e células gliais periféricas ao epicentro da lesão espinal resulta na indução da apoptose mediada por caspases e cisteínas proteases. A apoptose celular ocorre mais em oligodendrócitos, o que gera descontinuidade da bainha de mielina e consequente distúrbios de condução nervosa (Tator e Fehling, 1991; Li et al., 1996).

É observado um pico de apoptose neuronal com oito horas e glial com 24 horas (Liu et al., 1997). O aumento progressivo da apoptose e necrose tecidual acabam por formar cavitações na medula espinal (Tator e Fehling, 1991). Um segundo pico de apoptose neuronal e glial é descrito ao sétimo dia após a lesão, destacando-se o maior pico de apoptose de oligodendrócitos (Liu et al., 1997), o qual perdura por até três semanas, agravando a degeneração axonal (Xu et al., 2009).

A isquemia resulta em estresse oxidativo e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (também denominadas de radicais livres), cuja ação citotóxica exacerba a lesão tecidual (Olby, 1999; Arias et al., 2007). A peroxidação lipídica das membranas celulares fosfolipídicas é o resultado da ação dos radicais livres sobre as membranas biológicas. A peroxidação lipídica afeta sobretudo a bainha de mielina na substância branca e corpos

neurônais na substância cinzenta, o que gera distúrbios de condução e aumenta o número de células mortas (Olby, 1999; Bergman et al., 2000b).

A destruição celular inicial somada à apoptose e necrose isquêmica promovem a liberação de diversas substâncias intracelulares, dentre elas neurotransmissores e íons cálcio. O glutamato é um aminoácido excitatório que apresenta correlação com a gravidade da lesão espinal. O aumento da concentração de glutamato extracelular promove estimulação excessiva de receptores glutaminérgicos, dentre eles o N-metil-D-aspartato. A estimulação destes receptores aumenta o influxo de cálcio, sódio e cloretos, desequilibrando as concentrações de sódio e potássio (Hausmann, 2003). As concentrações de cálcio intracelulares aumentam ainda por abertura de canais de cálcio e aumento da permeabilidade das membranas celulares (Olby, 1999; Hausmann, 2003).

O aumento na concentração de cálcio intracelular gera necrose por ativação da calpaína e apoptose por ativação das caspases e calpaína. Estas proteases destroem o citoesqueleto e o DNA cromossomal (Olby, 1999). O cálcio ativa a fosfolipase A2 que atua nos fosfolípidos de membrana produzindo eicosanoides, espécies reativas de oxigênio e estimulação da resposta inflamatória (Hall, 1992; Olby, 1999).

A resposta inflamatória cursa com a produção de diversas citocinas e infiltração de leucócitos, sobretudo neutrófilos nas primeiras horas. Inicialmente, a migração de células inflamatórias para a lesão retarda a morte celular na lesão secundária, porém com cinco a sete dias após a lesão há predomínio de macrófagos, aumento da desmielinização e morte neuronal tardia, resultante da inflamação (Dusart e Schwab, 1994; Olby, 1999).

As células da micróglia liberam juntamente com os leucócitos, citocinas, interleucina-1(IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), peróxido de hidrogênio, óxido nítrico (ON) e proteinases minutos após a lesão primária, promovendo agravamento das lesões celulares, peroxidação lipídica e isquemia (Tator e Fehling, 1991; Hall, 1992; Olby, 1999; Chen et al., 2015).

A progressão da lesão secundária persiste por meses a anos na fase crônica (Hagg e Oudega, 2006). A barreira hemato-encefálica permanece permeável aos leucócitos e componentes séricos por até 14 dias, tempo no qual é observado infiltrado inflamatório na periferia da lesão (Silver e Miller, 2004). As células da micróglia, precursores de oligodendrócitos, células meningeais e astrócitos isolam a área acometida, formam uma densa cicatriz que reduz a progressão da inflamação e da morte celular (Yiu e He, 2006; Chen et al., 2015).

Os astrócitos tornam-se hipertrofiados com aumento da expressão de proteínas estruturais como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), vimentina e nestina. Adicionalmente, produzem grande quantidade de moléculas da matriz extracelular como os proteoglicanos. Os proteoglicanos, e sulfato de condroitina são depositados no epicentro da lesão e apresentam efeito inibitório às células gliais, sobretudo oligodendrócitos, impedindo a regeneração axonal (Silver e Miller, 2004; Yiu e He, 2006; Bradbury e Carter, 2011). Em um mês, as áreas de cavitação são bem definidas e o tecido necrótico é substituído por células gliais, sobretudo astrócitos, que irão formar a cicatriz glial (Bradbury e Carter, 2011).

2. Modelos experimentais

Os modelos experimentais são importantes ferramentas para investigar a eficácia de intervenções terapêuticas e para melhorar a compreensão dos eventos celulares e moleculares

envolvidos após a lesão da medula espinal (Metz et al., 2000; Vanický et al., 2001). Diferentes modelos de compressão, contusão, isquemia e secção sucederam o primeiro modelo descrito em 1911 (Allen, 1911) (tabela 1). Todos os modelos foram inicialmente aplicados na porção torácica da medula espinal, contudo há publicações mais recentes com a lesão na região cervical e poucos estudos na região dos segmentos espinais lombares (Cheriyani et al., 2014).

Tabela 1. Principais modelos experimentais de lesão da medula espinal de acordo com o mecanismo indutor da lesão primária.

Contusão/compressão	Compressão/isquemia	Transecção/hemorragia
MASCIS impactor	Clip de aneurisma	Total
OSU impactor	Compressão com balão	Parcial

Abreviações: MASCIS – Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study; OSU – Ohio State University.

Os modelos que utilizam como fator de indução da lesão primária a contusão incluem os aparelhos com queda livre de pesos sobre a medula espinal após exposição cirúrgica. Desenvolvido primeiramente em 1987 e aperfeiçoado em 1992 e 2000, o aparelho *Ohio State University (OSU) impactor* utiliza o impacto de uma probe eletromagnética controlado por computador. A probe sai de alturas de até 30mm e promove a lesão na medula após exposição cirúrgica da mesma (Strokes, 1992). O aparelho desenvolvido com o nome de *New York University impactor* em 1992 (Gruner, 1992) e recentemente adotado pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS)* permite que um peso de 10g, caia de alturas pré-estabelecidas (6,25; 12,5; 25 e 50mm) com monitoração dos parâmetros de rota, tempo e velocidade do impacto sobre a medula. Após o impacto que resulta em contusão, o peso é mantido por tempos variáveis, o que resulta em lesão compressiva adicional (Kwon et al., 2002). De todos os métodos, o que apresenta maior número de publicações é o MASCIS III impactor, por ser amplamente utilizado por centros de pesquisas em todo mundo nos últimos 10 anos (Gruner, 1992; Iwanami et al., 2005; Cheriyani et al., 2014). Devido ao custo destes equipamentos e das dificuldades referentes ao treinamento da equipe e manutenção dos dispositivos, diversos centros de pesquisa desenvolveram métodos semelhantes, como o aparelho estereotático modificado da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, o qual já teve sua eficácia experimental comprovada (Silva et al., 2008; Torres et al., 2010; Oliveira et al., 2014; Rosado et al., 2014).

As lesões compressivas da medula espinal resultam inevitavelmente em isquemia e portanto é difícil não correlacioná-las como fatores de lesão primária nos modelos de compressão por clip de aneurisma (Poon et al., 2007) e cateter com balão (Martin et al., 1992; Vanický et al., 2001). O clip de aneurisma é colocado no tecido nervoso após uma laminectomia consideravelmente menor que nas necessárias nos modelos com MASCIS impactor ou OSU impactor (Poon et al., 2007; Cheriyani et al., 2014). O clip pode permanecer por tempo variado (três segundos, um minuto ou cinco minutos) na medula e um forceps externo o mantém fechado com força entre 2 e 98g para promover lesão de leve a grave (Kwon et al., 2002; Poon et al., 2007). O modelo utilizando o balão do cateter de tromboembolotomia Fogart n.2 Fr. permite realizar uma compressão por cinco minutos com volumes diferentes da distensão do balão, sendo inicialmente descrito lesão leve da medula espinal com 10µL e grave com 30 µL (Martin et al., 1992; Vanický et al., 2001). Ambos são métodos de fácil reprodutibilidade, que exigem menor custo e permitem a quantificação da lesão e sua correlação com a recuperação funcional, contudo o número de publicações é menor do que com os aparelhos de contusão (Cheriyani et al., 2014).

A transecção da medula espinal é um modelo simples e largamente utilizado nas pesquisas de engenharia de tecido (Cheriyani et al., 2014). A transecção total do tecido espinal resulta em

completa dissociação entre os segmentos craniais e caudais, facilmente executado com lâmina de bisturi (Rossignol et al., 1999; Heimbürger, 2005). Martin et al (1992) registrou que ao distender o balão do cateter de Fogarty com volume acima de 40µL, o resultado é a transecção total da medula espinal, podendo ser utilizado este método em substituição à secção com lâmina. A hemiseção permite uma melhor avaliação da recuperação axonal, lesão menos grave (Rossignol et al., 1999; Kwon et al., 2002; Cloud et al., 2012) e cuidados pós-operatórios menos complexos que a transecção total, o que a torna mais utilizada do que os métodos de transecção total (Kwon et al., 2002; Cheriyan et al., 2014). Apresenta vantagem na avaliação das mudanças celulares e respostas de regeneração axonal por comparação do lado afetado com o contralateral (sem lesão) no mesmo animal (Rossignol et al., 1999).

Independente do modelo de lesão, diversos animais são utilizados nas pesquisas, contudo os ratos são os modelos animais mais estudados devido ao baixo custo de aquisição, manutenção, fácil manuseio e avaliação dos parâmetros fisiológicos (Metz et al., 2000; Vanický et al., 2001). Modelos com camundongos (Neirinckx et al., 2015), coelhos (Zhang et al., 2013), cães (Jung et al., 2009) suínos (Gutierrez et al., 2015), gatos (Rossignol et al., 1999; Gossard et al., 2015) e primatas também estão descritos (Iwanami et al., 2005).

Os estudos *in vitro* com culturas celulares e teciduais são uma alternativa crescente aos modelos experimentais com animais (*in vivo*), pois além de reduzirem o número de animais utilizados em experimentos, o custo é menor e há melhor acesso e avaliação dos eventos celulares e moleculares (Krassioukov et al., 2002), contudo perde-se a investigação dos diferentes efeitos do tratamento, real eficácia quando administrado no organismo e impede as avaliações funcionais (Vanický et al., 2001; Rossignol et al., 2007). Não se discute porém, que os estudos *in vitro* devem preceder qualquer tipo de estudo *in vivo* (Rossignol et al., 2007).

3. Terapias vigentes e em desenvolvimento

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) resultando em parestias, plegias e disfunções autonômicas (Webb et al., 2010). Dessa forma, o trauma espinal pode deixar sequelas debilitantes e permanentes com influências negativas sobre a qualidade de vida do paciente. O prognóstico é desfavorável, pois as terapias disponíveis têm resultados limitados na recuperação neurológica (Thuret et al., 2006).

Poucos recursos cirúrgicos e farmacológicos estão disponíveis e nenhum é capaz de reverter totalmente os danos neurológicos após a lesão espinal (Bergman et al., 2000a), no entanto, diferentes grupos de pesquisa se empenham em testar novas opções terapêuticas. Agentes farmacológicos vêm sendo testados, porém não demonstraram eficácia clínica significativa, como metilprednisolona, gangliosídeos, naloxona, hormônio liberador de tireotropina e nimodipina (Rowland et al., 2008).

3.1. Terapia imunomodulatória

Os corticosteroides são utilizados há mais de 30 anos na medicina humana para o tratamento de pacientes com lesão espinal aguda. A princípio, as propriedades anti-inflamatórias destes fármacos eram cogitadas para auxiliar na redução do edema e da infiltração de células inflamatórias no centro da lesão (Ducker e Zeidman, 1994).

Os mecanismos precisos pelos quais os corticosteroides promovem neuroproteção não são completamente compreendidos, sendo propostos: a inibição da peroxidação lipídica e de liberação de citocinas pró-inflamatórias, modulação da resposta imune e células inflamatórias, auxílio no aumento da perfusão vascular e prevenção do influxo de cálcio (Tator e Fehlings, 1991; Young, 2000). A inibição da peroxidação lipídica parece ser a principal propriedade neuroprotetora dos glicocorticóides, destacando-se a metilprednisolona como fármaco mais eficaz deste grupo (Von Euler et al., 1996; Kwon et al., 2004).

A utilização de metilprednisolona é recomendada em pacientes humanos com base nos resultados de estudos clínicos multicêntricos realizados pelo NASCIS (*National Acute Spinal Cord Injury Studies*) - a saber: NASCIS I, II e III. Apesar destes estudos formarem a base da utilização da metilprednisolona na prática clínica da medicina humana, as crescentes críticas dirigidas à interpretação e conclusões dos estudos resultaram na interrupção desta terapia em alguns hospitais nos Estados Unidos e Europa. Adicionalmente, foram demonstrados efeitos deletérios na lesão espinal e no estado geral do paciente, uma vez que a dose utilizada no trauma espinal é significativamente elevada (Coleman et al., 2000; Hurlbert, 2000; Short et al., 2000; Hurlbert, 2001). A controvérsia sobre os benefícios de metilprednisolona destaca a necessidade de se desenvolver melhores agentes neuroprotetores com eficácia mais convincente (Kwon et al., 2004). Donnelly e Popovich (2008) sugerem que frente à duplicidade de efeitos benéficos e deletérios promovidos pela reação inflamatória no SNC, a supressão geral promovida pelos glicocorticóides resulta na ausência de efeitos terapêuticos satisfatórios.

A utilização de agentes antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) pode resultar em melhores respostas terapêuticas frente à lesão medular, sobretudo quando se utiliza AINEs seletivos para ciclooxigenase do tipo 2 (COX-2). A expressão da COX-2 aumenta após contusão ou compressão experimental em ratos, o que justifica a recuperação funcional parcial com a utilização experimental de inibidores seletivos COX-2 em alguns estudos (Resnick et al., 1998; Hains et al., 2001). No entanto, mais estudos são necessários para comprovar o benefício desses fármacos (Kwon et al., 2004).

3.2. Terapia com inibidores e antagonistas de canais iônicos e receptores de glutamato

Antagonistas do receptor de NMDA (N-metil-D-aspartato), tais como MK801 e gaciclidina (GK11), demonstraram efeitos neuroprotetores após a lesão da medula espinal experimental em animais (Gaviria et al., 2000a; Gaviria et al., 2000b). O desenvolvimento de antagonistas do receptor NMDA é relativamente difícil devido à distribuição generalizada do glutamato e seus receptores no SNC, o que torna os efeitos colaterais significativos e não favorecem a transposição para aplicação clínica até o momento (Kwon et al., 2004).

Bloqueadores dos canais de cálcio também são pesquisados como meio para reduzir o influxo de cálcio nas células, sobretudo mediado pelos receptores NMDA. Alguns autores afirmam que os efeitos fisiológicos predominantes dos bloqueadores de canais de cálcio são mediados por sua ação sobre a musculatura lisa de vasos ao invés da alteração do fluxo de cálcio nos neurônios e células gliais (Fehlings et al., 1989). Os bloqueadores de canais de cálcio podem levar a hipotensão arterial quando administrados sistemicamente, o que prejudica a perfusão sanguínea no tecido nervoso, sobretudo na lesão espinal que apresenta isquemia e perda da regulação do fluxo sanguíneo normal (Kwon et al., 2004).

A nimodipina e a tetrodotoxina são exemplos de bloqueadores estudados inclusive em estudos clínicos. A nimodipina não demonstrou resultados satisfatórios em estudos clínicos em humanos

(Pointillart et al., 2000), enquanto a tetrodotoxina demonstra recuperação funcional em modelos animais de lesão espinal tratados com aplicações intralesionais (Teng e Wrathall, 1997; Rosenberg et al., 1999). No entanto, a mesma não tem ainda aplicação clínica (Kwon et al., 2004).

O riluzol, outro bloqueador de canal de sódio, apresentou resultados satisfatórios em modelos animais, com preservação da substância branca e cinzenta após trauma agudo e recuperação parcial da função locomotora em ratos (Schwartz e Fehlings, 2001). Riluzol é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da esclerose lateral amiotrófica nos Estados Unidos, no entanto, alguns problemas farmacocinéticos e casos de toxicidade já foram relatados nos pacientes humanos tratados. Sua aplicação em pacientes com lesão espinal aguda permanece em âmbito pré-clínico (Kwon et al., 2004).

Outro medicamento que atua inibindo a excitotoxicidade mediada pelo Ca^{2+} é o Dantrolene. Este fármaco inibe o receptor de canais de Ca^{2+} rianodina (RyR) localizados no retículo endoplasmático de células musculares estriadas esqueléticas (subtipo RyR1) e células neuronais (subtipo RyR3) (Zhao et al 2001;. Kobayashi et al 2005). Ao inibir os receptores, esta droga impede o aumento de Ca^{2+} citoplasmático responsável pela ativação de caspases e indução da apoptose neuronal (Cherednichenko et al 2008; Torres et al., 2010; Rosado, 2011).

Pesquisas demonstraram que o dantrolene apresenta efeito neuroprotetor em diferentes modelos de lesão no sistema nervoso central como isquemia (Gwak et al. 2008; Kocogullari et al. 2008), epilepsia (Mori et al., 2005) e traumatismo espinal (Torres et al., 2010; Rosado, 2011), no entanto sua utilização nas afecções do SNC continua em fase pré-clínica.

Apesar dos resultados positivos com diferentes fármacos que antagonizam receptores NMDA e receptores não-NMDA, não existem terapias disponíveis na clínica com comprovada capacidade de reduzir a excitotoxicidade, em parte por causa da patogênese do trauma espinal e também pelos efeitos colaterais descritos em animais (Olby, 2010).

3.3. Terapia celular

Diversos grupos de pesquisa trabalham com o transplante de células na tentativa de substituir o tecido danificado ou promover neuroproteção (Okamoto e Campos, 2004). As células de Schwann e as células do bulbo olfatório têm sido utilizadas experimentalmente para promover a remielinização e a regeneração de axônios danificados no trauma espinal. As células de Schwann podem ser expandidas em cultura a partir de biópsias de nervos do próprio paciente sendo utilizadas posteriormente. No entanto, a reintegração dos axônios ainda é limitada após o transplante de células de Schwann no local da lesão, sobretudo devido à presença da cicatriz glial. Terapias associando as células de Schwann com a aplicação de condroitinases tem demonstrado resultados melhores que a aplicação isolada das células de Schwann (Fortun et al., 2009).

O transplante de células do bulbo olfatório também pode ser realizado a partir de células do próprio paciente. Estas células podem ser colhidas da mucosa nasal e aplicadas diretamente na lesão espinal. Elas se integram bem ao tecido nervoso e promovem regeneração axonal por contribuir com a formação de mielina. Estas células estão em estudo clínico em humanos (Ito et al., 2006).

As células-tronco (CT) são células primitivas e indiferenciadas capazes de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens de células e tecidos (Caplan, 1991), portanto muito utilizadas em estudos com lesão espinal devido ao grande potencial de regeneração creditado a esse grupo celular (Olby, 2010). Existem diferentes sub-grupos de células-tronco, que podem ser divididos de acordo com a capacidade de diferenciação das células-tronco, ou de acordo com a fase do desenvolvimento do organismo no qual são encontradas (Caplan, 1991; Meirelles et al., 2009b).

As células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa interna do blastocisto cinco a sete dias após a fertilização (em humanos) e podem ser expandidas em cultura na presença de fatores que impeçam sua diferenciação (Schwindt et al., 2005). Durante a embriogênese, a massa interna do blastocisto irá gerar o epiblasto, que será responsável pela formação dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma. Nesse sentido, CTE aplicadas em camundongos imunossuprimidos resultam na formação de teratomas e teratocarcinomas, tumores que contêm tipos celulares dos três folhetos embrionários (Yao et al., 2006). Um dos maiores desafios para utilização deste tipo celular na terapia é o controle sobre sua diferenciação (Schwindt et al., 2005).

Apesar das complicações potenciais envolvidas na utilização clínica das CTE, em outubro de 2010 o FDA concedeu pela primeira vez a autorização para a utilização de células derivadas de CTE humanas em estudo clínico (fase 1) em pacientes humanos (Pollack, 2010). Neste estudo, pacientes com lesão espinal (classificação ASIA A em nível T3-T11) voluntários foram selecionados e receberam aplicação *in situ* de precursores de oligodendrócitos (linhagem GRNOPC1 da empresa Geron Corporation) obtidos a partir da diferenciação de CTE humanas. A utilização deste tipo celular foi previamente validada em experimentação animal (Keirstead et al., 2005; Zhang et al., 2007; Okamura et al., 2007). O estudo iniciado pela Geron e finalizado em Janeiro de 2014 pela Asterias Biotherapeutics Inc., ainda não apresenta resultados divulgados (Clinical Trials, 2016).

As células-tronco neurais (CTN) podem ser obtidas a partir de embriões e adultos e podem se diferenciar em linhagens neuronais ou gliais (Milward et al., 1997). Diversos estudos com este tipo celular com resultados satisfatórios já estão publicados na terapia experimental da lesão espinal (Olby, 2010). A principal aplicação experimental é o transplante de precursores de oligodendrócitos obtidos a partir de culturas de células-tronco neurais, os quais após o transplante geram oligodendrócitos capazes de formar a bainha de mielina e promover recuperação morfológica e clínica parcial. Estudos clínicos com este tipo celular foram aprovados pelo FDA e estão em análise em humanos (Thuret et al., 2006; Olby, 2010).

As células-tronco somáticas (CTS) são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (Haas et al., 2005). Apresentam capacidade de auto-renovação e limitada diferenciação, normalmente restrita aos tipos celulares dos tecidos em que são encontradas (Choumerianou et al., 2008). Estas células são as mais utilizadas em ensaios pré-clínicos e clínicos e têm sido utilizadas terapêuticamente desde a década de 1950 no tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoiético, através do transplante de medula óssea (Okamoto e Campos, 2004).

Uma das fontes mais utilizadas para extração de CTS é a medula óssea, na qual são encontrados dois tipos de CT: as hematopoiéticas (CTH) e as mesenquimais (CTM) (Schwindt et al., 2005; Choumerianou et al., 2008). As CTH são utilizadas predominantemente para o tratamento de

doenças hematológicas e portanto não serão discutidas na lesão espinal. As CTM são consideradas multipotentes com ampla plasticidade, capazes de promover a manutenção e regeneração de múltiplas linhagens de células do organismo (Deans e Moseley 2000; Nauta e Fibbe 2007). O potencial terapêuticos das CTM é tão grande que existem 344 estudos clínicos registrados, sendo 31,4% em fase I, 49,6% em fase II, 15,3% em fase III e 3,7% em fase IV (Wei et al., 2013; Clinical Trials, 2016). As pesquisas registradas com CTM em lesões espinais ocupam a quarta posição entre as 14 principais doenças pesquisadas, retirando-se da análise as afecções imunomediadas como a esclerose múltipla (Wei et al., 2013).

Atualmente, acredita-se que a utilização de CTM no trauma espinal auxilia na reparação da área de lesão por promover a formação de novas células da linhagem neural (Sanchez-Ramos, 2002), modular a resposta inflamatória (Meirelles et al., 2009a), secretar fatores de crescimento e estimular as células gliais a produzir fatores neurotróficos (Majunder et al., 1998; Wang et al., 2002), promover inibição de apoptose (Dasari et al., 2007), diminuição da área de lesão (Ankeny et al., 2004; Ide et al., 2010), estimulação de rebrotamento axonal (Ankeny et al., 2004) e recuperação funcional (Dasari et al., 2007; Ide et al., 2010).

Acredita-se que a principal contribuição das CTM seja o controle da resposta inflamatória e a secreção de fatores neuroprotetores, e não a substituição de células neurais (Nandoe Tewarie et al., 2009; Ide et al., 2010). No entanto, o mecanismo exato de neuroproteção ainda não está completamente esclarecido, assim como o momento e via ideal para aplicação das CTM (Nandoe Tewarie et al., 2009). Frente à duplicidade de ação do processo inflamatório após o trauma medular, a utilização das CTM pode resultar em benefícios maiores que as terapias vigentes, pois permite potencializar a proteção do tecido neural através da secreção de neurotrofinas e fatores neuroprotetores, bem como minimizar simultaneamente o processo inflamatório que exacerba a lesão neuronal (Dasari et al., 2007; Ide et al., 2010).

CAPÍTULO II

Criopreservação de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco somáticas que apresentam capacidade de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens de células e tecidos (Caplan, 1991; Deans e Moseley 2000; Nauta e Fibbe 2007; Meirelles et al., 2009b), são amplamente utilizadas em ensaios pré-clínicos e estudos clínicos de medicina regenerativa (Okamoto e Campos, 2004).

As CTM foram descritas pela primeira vez, em 1966 por Alexander Friedenstein e colaboradores, caracterizadas em cultura de células mononucleares da medula óssea (MO) e denominadas de células formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F, *colony forming units – fibroblastic*) (Friedenstein et al., 1970; Owen, 1988). As CTM estão presentes em pequenas quantidades nas regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo a MO, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular, sangue periférico, parede dos vasos que compõem o cordão umbilical e os órgãos parenquimatosos (Koerner et al., 2006; Meirelles et al., 2008; Zucconi et al., 2010). Embora a MO constitua um dos principais sítios doadores das CTM (Pittenger et al., 1999; Minguell et al., 2000), o tecido adiposo e o cordão umbilical são fontes com ampla utilização para o isolamento de CTM (Zuk et al., 2001; Covas et al., 2003).

Diferentes grupos trabalhando independentemente demonstraram que as CTM derivadas do tecido adiposo apresentam grande capacidade de diferenciação em outros tecidos, e que o tecido adiposo é uma fonte abundante de CTM, o que aumenta o interesse de pesquisas com esta fonte de células (Frey et al., 2006; Schäffler e Büchler, 2007; Minonzio et al., 2014). As CTM podem ser extraídas do tecido adiposo intra-abdominal ou subcutâneo, que rotineiramente é descartado em procedimentos de lipoaspiração ou demais intervenções cirúrgicas (Choudhery et al., 2014), e isoladas por processamento enzimático com collagenase tipo I (Locke et al., 2009; Rada et al., 2009). Devido a ampla distribuição do tecido adiposo pelo corpo e obtenção potencial em procedimentos cirúrgicos cosméticos, o isolamento de CTM do tecido adiposo torna-se mais prático do que a medula óssea, a qual ainda implica método de coleta doloroso e baixo rendimento de CTM (Schäffler e Büchler, 2007; Choudhery et al., 2014).

A utilização das CTM no tratamento de diversas doenças tem sido amplamente pesquisada tanto em grupos de Engenharia de Tecidos como em Medicina Regenerativa (Schäffler e Büchler, 2007; Meirelles et al., 2009b; Rada et al., 2009). A possibilidade de utilizar as células do próprio paciente (transplante autólogo) requer uma fonte rica em CTM, destacando-se o tecido adiposo por permitir a obtenção de grande número de CTM (Choudhery et al., 2014). Adicionalmente, devido as propriedades de imunomodulação demonstradas pelas CTM (Rasmusson, 2006; Patel et al., 2008), a possibilidade de transplantes alógenos tem sido cada vez mais estudada. Contudo, em ambas possibilidades de transplantes, o tempo necessário para obtenção e isolamento das CTM pode dificultar ou impedir a utilização desta modalidade terapêutica. Preservar as células para disponibilizá-las rapidamente é importante para aplicações clínicas de afecções com pequena janela terapêutica (Frey et al., 2006; Renzi et al., 2012; Choudhery et al., 2014; Minonzio et al., 2014). A criopreservação é o método mais viável e reprodutível de preservar as células para aplicação futura. Bancos de células-tronco oferecem a oportunidade de preservar as CTM em condições viáveis por longos períodos (anos) até que sejam necessárias para terapia (Choudhery et al., 2014).

No presente trabalho foram testados três meios de criopreservação para congelamento de CTM derivadas do tecido adiposo de ratos, com objetivo de obter o melhor protocolo para congelamento e descongelamento sem comprometer as propriedades das CTM, e criar um banco de células de ratos Lewis transgênicos para a proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* – GFP) para pesquisas pré-clínicas futuras.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), sendo iniciado após a aprovação sob protocolo de nº. 41/2012 (anexo I).

Foram utilizadas as instalações do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) e do Biotério Experimental do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) para as etapas referentes à obtenção, cultivo, caracterização e criopreservação das CTM.

Animais

Dez ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis, machos, transgênicos homozigóticos para proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* – GFP) (LEW-Tg eGFP F455/Rrrc), de quatro semanas de vida, massa corporal média de 150g, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICB-UFMG foram utilizados para colheita de tecido adiposo e obtenção de CTM.

Coleta, cultivo e expansão de CTM de tecido adiposo

Dez animais foram utilizados para obtenção das CTM provenientes do tecido adiposo. Os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂ e posteriormente foi realizada a tricotomia e antissepsia do abdômen para colheita do tecido adiposo retroperitoneal. A colheita foi realizada em capela de fluxo laminar no Biotério do Departamento de Bioquímica no Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Através de celiotomia mediana retro-umbilical a cavidade abdominal foi exposta e o tecido adiposo retroperitoneal próximo à pelve foi cuidadosamente colhido sem inclusão de vasos visíveis e vísceras vizinhas. Aproximadamente 30 gramas de tecido adiposo foi obtido de cada animal, lavados por imersão em solução 0,15M de PBS pH 7,2 e transferidos para frascos de 50mL¹ contendo o meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM²) com penicilina, estreptomicina e anfotericina B (PSA³) sem soro fetal bovino (SFB⁴). As amostras foram transportadas à sala de cultivo celular do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) no ICB para processamento.

Sob condições de assepsia, os frascos contendo o tecido adiposo foram transferidos para capela de segurança biológica grau II na sala de cultivo celular do LICM. Em cada frasco contendo 30 gramas de tecido, a solução de PBS foi substituída por 10mL de uma nova solução de PBS 0,15M contendo 0,15% p/v de colagenase tipo I dissolvida para digestão enzimática. Os frascos foram incubados por 60 min a 37° C e agitados a cada 15 min. Transcorrido o tempo, foram adicionados em cada frasco 20mL de DMEM com 10% de SFB para inativação da enzima. O

¹ Tubo Falcon 50mL - Sarstedt®.

² DMEM *high glucose with L-glutamine and without sodium bicarbonate* - Sigma-Aldrich®.

³ *Antibiotic Antimycotic Solution 100x* - Sigma-Aldrich®.

⁴ *Fetal Bovine Serum, qualified, US origin* - Gibco®.

conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e 23°C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet contendo as células foi ressuscitado em 10mL de DMEM com 10% de SFB, e plaqueado em garrafas⁵ de 75cm².

As garrafas foram mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C durante 24 horas. No dia seguinte, o meio de cultura das garrafas foi removido por pipetagem e transferido para um tubo de 50mL. O tubo foi submetido a centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm e 23°C e o pellet formado foi ressuscitado e plaqueado em uma nova garrafa de 75cm². As garrafas que tiveram o meio removido receberam 10mL do meio DMEM com 10% de SFB e retornaram a estufa.

As garrafas de cultura foram avaliadas a cada 72 horas em microscópio ótico invertido e tiveram seu meio de cultura trocados. Ao atingir 80 ou 90% de confluência, as células foram removidas da garrafa de cultivo e replaqueadas em novas garrafas para permitir a expansão celular, etapa esta denominada de passagem celular. Para realizar a passagem celular, as garrafas tiveram o meio de cultura removido e foram lavadas duas vezes com 5mL de PBS 0,15M. Posteriormente, adicionou-se 1mL de solução de tripsina-EDTA⁶ em cada garrafa e as mesmas foram mantidas na estufa por 5 minutos para ação enzimática. Após o tempo determinado, as garrafas foram submetidas à rápida avaliação microscópica para confirmar o desprendimento das células e foi adicionado 2mL de meio DMEM com 10% de SFB para inativar a tripsina.

O conteúdo das garrafas foi transferido para tubos de 50mL e centrifugado por 10 min a 1500 rpm e 23°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuscitado em 1mL de meio DMEM com 10% de SFB. Uma alíquota de 2µL da solução contendo as células foi adicionada a 98µL de solução de Turkey homogeneizada e transferida para câmara de Neubauer para contagem da concentração celular. Foram replaqueados em cada passagem 2,0 x 10⁴ células por garrafa (75cm²). As garrafas foram mantidas na estufa sob as mesmas condições anteriores, monitoradas diariamente e submetidas às trocas de meio de cultura a cada 72 horas.

O processo de expansão celular foi realizado até a quarta passagem, momento no qual ao invés de serem replaqueadas, as células foram submetidas a três protocolos de criopreservação, visando obter um melhor método para formação de um banco de CTM congeladas. Quatro garrafas foram mantidas em cultura para as etapas de caracterização das células-tronco mesenquimais, seguindo as normas da Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy – ISCT*) publicadas por Dominici et al. (2006) e Bourin et al. (2013).

Grupos experimentais

O experimento foi realizado em duas etapas: 1^a. escolha do protocolo de criopreservação; 2^a. realização dos testes de diferenciação e imunofenotipagem pós-criopreservação.

As células isoladas e cultivadas foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais para testar o melhor protocolo de criopreservação, da seguinte forma:

- Grupo A - foram submetidas ao congelamento em meio composto por 50% de DMEM, 40% SFB e 10% DMSO;

⁵ TC flasks with ventilation, 75 cm² - Sarstedt®.

⁶ 0.05% Trypsin-EDTA - Gibco®

- Grupo B - foram submetidas ao congelamento em meio composto por 90% SFB e 10% DMSO;

- Grupo C - foram submetidas ao congelamento em meio composto por 80% SFB e 20% DMSO.

As culturas criopreservadas que apresentaram maiores valores de viabilidade após descongelamento foram submetidas à imunofenotipagem e diferenciação celular.

Caracterização das CTM

Todas as etapas de caracterização das CTM foram realizados antes do congelamento e após os descongelamentos das células criopreservadas no meio de congelamento que apresentou maior valor nos testes de viabilidade celular.

Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As CTM da quarta passagem e as células descongeladas, foram submetidas à imunofenotipagem utilizando-se os anticorpos anti-CD45⁷, anti-CD90⁸, anti-CD73⁹, anti-CD54¹⁰, anti-CD 34¹¹, anti-MHC I¹² e anti-MHC II¹³. Para cada anticorpo foram utilizadas $1,0 \times 10^6$ células, sendo o procedimento realizado em triplicata. Após a tripsinização, as células foram contadas em câmara de Neubauer e divididas em 27 eppendorffs identificados com os anticorpos testados, o controle da reação (branco) e o controle do anticorpo secundário. As células foram duas vezes lavadas com 1,0mL de PBS e centrifugadas durante 7 min à 1400rpm e 23°C. Posteriormente, cada amostra foi incubada por 30min a 4°C com solução de PBS contendo o anticorpo primário. Seguiu-se a centrifugação dos eppendorffs, descarte do sobrenadante, duas lavagens com solução de PBS e a incubação com o anticorpo secundário Alexa 555®¹⁴ sob as mesmas condições do anterior. O controle da reação (branco) recebeu apenas PBS em cada um dos momentos de incubação com anticorpo e o controle do anticorpo secundário recebeu PBS no primeiro momento e o anticorpo secundário posteriormente. As populações de células analisadas foram determinadas pelo gráfico de tamanho versus granulosidade obtido de células sem nenhum tipo de marcação.

A avaliação foi realizada no citômetro de fluxo Guava easyCyte¹⁵ com um total de 5.000 eventos por leitura de amostra, sendo as leituras realizadas em triplicata. Os dados foram analisados no software FlowJo®.

Diferenciação *in vitro*

Foram realizadas as diferenciações osteogênica, condrogênica e adipogênica de uma alíquota representativa da cultura de cada replicata biológica pré e 90 dias pós-congelamento, segundo Pittenger et al. (1999), Deans e Moseley (2000) e Dominici et al. (2006).

⁷ CD45 clone 69 mouse - BD Bioscience®.

⁸ CD90 clone Ox-7 mouse - AbCam®.

⁹ CD73 clone 5 F/B9 mouse - AbCam®.

¹⁰ CD54 clone 1A29 mouse - AbCam®.

¹¹ CD34 clone ICO115 mouse - Santa Cruz Biotechnology®.

¹² MHC class I clone OX-18 - AbCam®.

¹³ MHC class II clone OX-3 - AbCam®.

¹⁴ Alexa 555 goat anti mouse - Invitrogen®.

¹⁵ Guava esayCyte™ Single Sample Flow Cytometer- Milipore®.

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços¹⁶ na densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço para indução da diferenciação osteogênica e adipogênica. O procedimento foi realizado em triplicata com controle da diferenciação sendo mantido em meio DMEM enriquecido com 10% de SFB.

O meio indutor da diferenciação osteogênica foi confeccionado adicionando-se ao DMEM com 10% de SFB, 0,55g de beta-glicerofosfato¹⁷, 0,01g de vitamina C¹⁸ e 2,17 μ L de dexametasona 0,4%¹⁹. Após 24 horas na placa de 6 poços, o meio de 3 poços foi trocado pelo meio osteogênico e o procedimento foi repetido a cada 72 horas durante 21 dias. Para identificação da diferenciação, os poços foram lavados com PBS e fixados em álcool 70° por 24 horas e posteriormente submetidos a coloração por Von Kossa.

O meio indutor da diferenciação adipogênica foi confeccionado adicionando-se 2,17 μ L de dexametasona 0,4%, 400 μ L de insulina²⁰, 200 μ M de indometacina cristalina²¹ e 500 μ M de isobutilmetilxantina²² ao meio DMEM sem SFB. A diferenciação adipogênica foi mantida por 21 dias e identificada por coloração com Oil Red O após fixação das células como descrito anteriormente.

A diferenciação condrogênica foi realizada em *pellet* celular, diferentemente das anteriores. Os *pellets* celulares foram obtidos após centrifugação de $1,0 \times 10^6$ células em tubos de 15mL. O experimento foi realizado em triplicata e o controle da reação também foi feito em *pellets* celulares adicionando-se meio DMEM com 10% de SFB. O meio de diferenciação condrogênica era composto de DMEM com 1% de SFB, 1% de piruvato 1mM²³, 200 μ L de insulina, 6,5 μ L de transferrina²⁴, 5mg de vitamina C, 0,125mg de albumina de soro bovino (bovine serum albumin – BSA²⁵), 10 μ L de dexametasona 0,4% e 1,0 μ L de TGF-beta²⁶, sendo o último adicionado no momento da troca do meio. O meio foi trocado uma vez por semana até o 21° dia, momento em que os *pellets* celulares foram fixados com paraformaldeído²⁷ 4% tamponado por 2 horas e submetidos ao processamento rotineiro para obtenção de cortes em paraplast. As lâminas foram confeccionadas com cortes de 4 μ m e coradas com Alcian Blue e Hematoxilina para identificação da diferenciação condrogênica.

Criopreservação das CTM

As CTM da quarta passagem foram desprendidas das garrafas com solução de tripsina-EDTA, centrifugadas, ressuspensas em PBS, e contadas em câmara de Neubauer para obter-se um mínimo de 1×10^6 células para se realizar o congelamento.

As células foram novamente centrifugadas e, aleatoriamente divididas em três grupos experimentais (item 2.2) para serem ressuspensas nos meios de congelamento testados (A, B e C). As células foram congeladas em criotubos²⁸ na concentração de 1×10^6 células/criotubo.

¹⁶ Tissue culture test plates 6-well - TPP®.

¹⁷ β -Glycerophosphate disodium salt hydrate - Sigma-Aldrich®.

¹⁸ L-Ascorbic acid powder - Sigma-Aldrich®.

¹⁹ Azium® 2mg/mL – Schering-Plough Coopers®.

²⁰ Novolin® N 100 UI – Nordisk®.

²¹ 5-Methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid - Sigma-Aldrich®.

²² 3-Isobutyl-1-methylxanthine - Sigma-Aldrich®.

²³ Piruvato sódico - Sigma-Aldrich®.

²⁴ Transferrina humana liofilizada - Sigma-Aldrich®.

²⁵ Albumina de soro bovino - Sigma-Aldrich®.

²⁶ Transforming Growth Factor- β 1 from human platelets - Sigma-Aldrich®.

²⁷ Paraformaldeído em pó - Sigma-Aldrich®.

²⁸ CryoPure storage system - Sarstedt®.

O congelamento foi realizado no container de congelação Nalgene®²⁹ no freezer a -80°C. As amostras permaneceram estocadas em caixas identificadas no freezer a -80°C por período máximo de 90 dias.

Descongelamento das CTM

Nos tempos 30, 60 e 90 dias após o congelamento, amostras de cada grupo experimental foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C e replaqueadas em garrafas de cultura para a realização dos testes de viabilidade celular.

Testes de viabilidade celular

A avaliação de viabilidade celular foi realizada pelo teste de coloração com Azul de Tripán e pelo ensaio de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide³⁰]. Os estudos foram realizados em amostras de células na quarta passagem antes do congelamento, amostras de células após 30 dias, 60 dias e 90 dias de congelamento, em triplicata, para cada grupo experimental.

Imediatamente após o descongelamento, em todos os tempos experimentais, uma amostra de cada grupo experimental foi submetida à coloração com azul de Tripán³¹ e avaliadas imediatamente por microscopia óptica, visando estabelecer a viabilidade imediata após o descongelamento. O mesmo teste foi realizado previamente ao congelamento.

Para o teste de conversão do MTT em cristais de formazan, após o descongelamento, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços, na concentração de 1×10^5 células/poço, e cultivadas por 48 horas em meio DMEM com 10% de SFB. O meio foi removido e os poços lavados com 1,0mL de PBS 0,15M, seguindo-se adição de 210µL de DMEM e 170µL de MTT (5mg/mL) por poço. Após incubação de duas horas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C, a reação foi solubilizada com 210µL de ácido clorídrico com 10% de sódio dodecil sulfato (HCl 10% SDS), e mantida por 24 horas. Posteriormente, 100µL de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços e lidos no espectrofotômetro em 595nm de comprimento de onda, em triplicata.

Análise estatística

As culturas celulares obtidas dos dez animais foram aleatoriamente divididas em três grupos para avaliação dos meios de criopreservação. Realizou-se análise de variância (ANOVA) e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Os resultados obtidos através da citometria de fluxo e dos testes de viabilidade e proliferação celular foram submetidos à ANOVA *two-way* seguido pelo teste de Bonferroni. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do *Prism 5 for Windows, version 5.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA*.

RESULTADOS

Coleta, cultivo e expansão de CTM de tecido adiposo

As culturas primárias, obtidas após o processamento do tecido adiposo eram compostas por uma população heterogênea de células, apresentando células aderentes a superfície plástica das

²⁹ *Freezing container* Nalgene® *Mr. Frosty* - Sigma-Aldrich®.

³⁰ MTT Formazan - Sigma-Aldrich®.

³¹ Azul de Tripán - Sigma-Aldrich®.

garrafas de cultura, de formato fusiforme e células não aderentes, de formato arredondado. As culturas começaram a apresentar células aderentes, com morfologia fibroblastóide, 24 horas após o plaqueamento no meio DMEM completo (Fig. 1A e 1B). Ao longo do cultivo, com a expansão celular e com a troca dos meios de cultura, o número de células não aderentes diminuiu, predominando a população de células aderentes de formato fusiforme (Fig. 1C), com potencial de auto-renovação e formação de colônias.

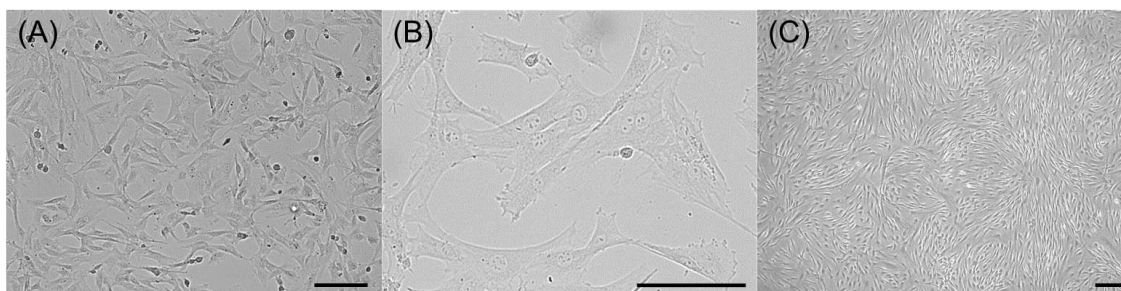


Figura 1. Fotomicrografia de contraste de fase das células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo de ratos GFP. (A) Células com aspecto fibroblastóides, aderidas à superfície de cultivo e distribuídas em toda extensão das garrafas de cultura. Notar presença de células arredondadas. (B) Maior aumento das células fibroblastóides com evidência do núcleo e prolongamentos citoplasmáticos responsáveis pela adesão celular. (C) Menor aumento de uma cultura em quarta passagem demonstrando confluência das células acima de 80%. Barra = 100 μ m.

Após três dias de cultivo, foi observada confluência de 80% nas culturas de células provenientes do tecido adiposo, sendo então realizada a primeira passagem. Foram necessários intervalos de 3 a 5 dias para os demais plaqueamentos até a obtenção da quarta passagem.

Caracterização das CTM

A análise do imunofenótipo das populações de CTM foi realizada na quarta passagem previamente ao congelamento. A população analisada obtida de células sem nenhum tipo de marcação foi denominada de população R1 (Fig. 2A). A análise dos histogramas obtidos por citometria de fluxo, demonstrou que as células cultivadas a partir do tecido adiposo apresentaram expressão de negativa para CD11b/c, CD34, e CD45; expressão positiva para CD54, CD73, CD90 e MHCII; baixa expressão de MHC I (tabela 1) previamente ao congelamento (Fig. 2B-J).

Tabela 1. Médias e desvio padrão da expressão imunofenotípica das CTM previamente ao congelamento.

ANTICORPOS	Amostra pré-congelamento
Controle (branco)	0,89% \pm 0,44
Alexa 555	2,63% \pm 0,37
Anti-CD11b/c	4,87% \pm 1,83
Anti-CD34	3,14% \pm 0,27
Anti-CD45	3,95% \pm 2,21
Anti-CD54	90,97% \pm 4,87
Anti-CD73	90,48% \pm 4,26
Anti-CD90	95,10% \pm 3,75
Anti-MHC I	10,56% \pm 8,48
Anti-MHC II	88,73% \pm 9.10

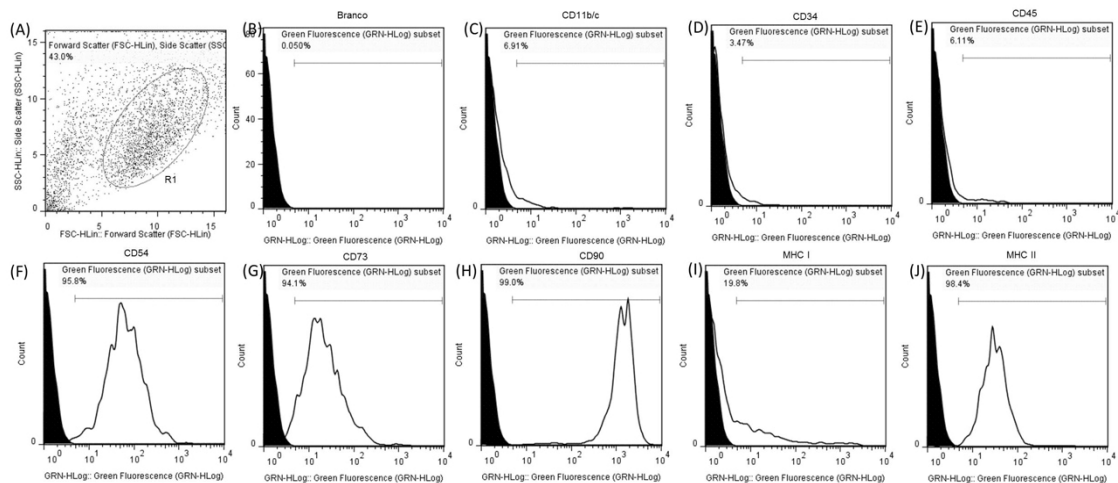


Figura 2. Histogramas da expressão de CD 11b, CD34, CD45, CD54, CD73, CD90, MHC-I e MHC-II por citometria de fluxo em CTM obtidas do tecido adiposo após a quarta passagem. (A) Representa a população selecionada para análise - R1 - no gráfico de tamanho *versus* granulosidade. (B-J) Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva preenchida é o controle negativo da fluorescência e a curva branca, representa a população de células avaliadas para um marcador específico, considerada positiva acima de 10^1 .

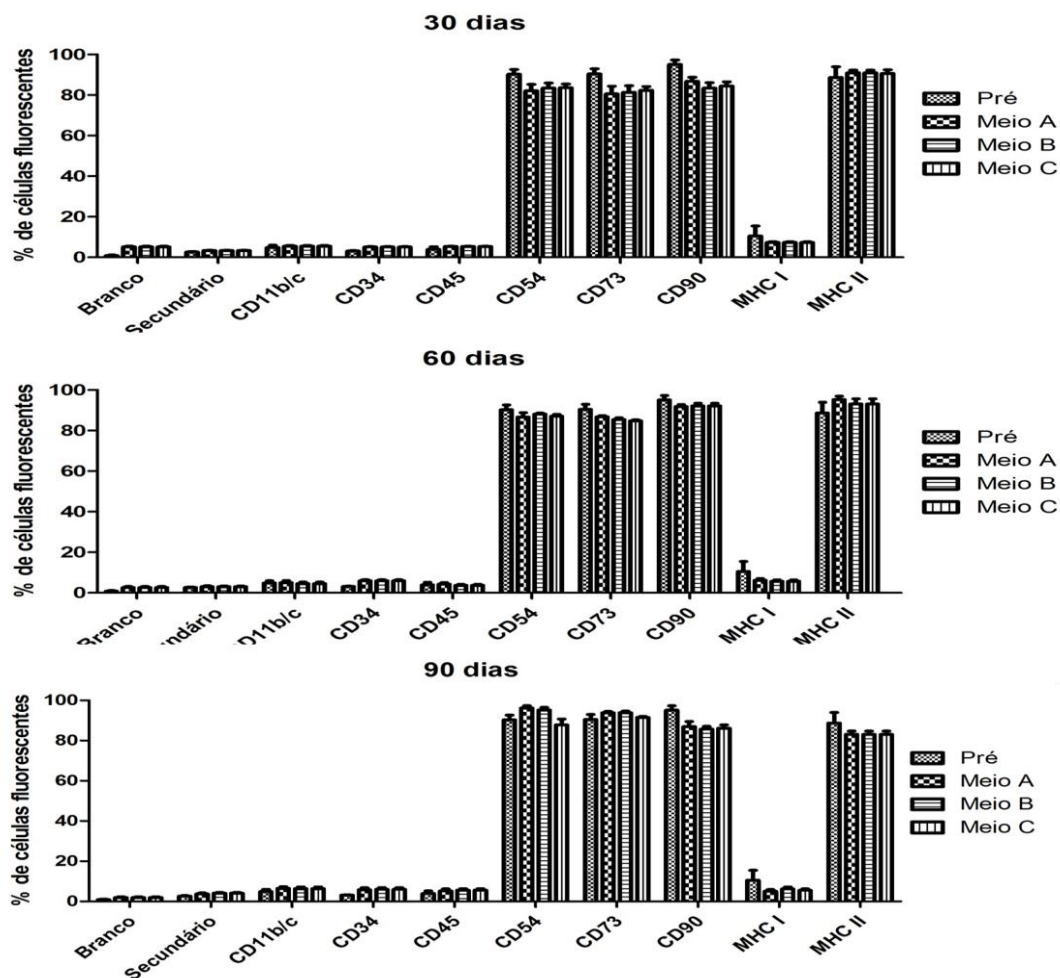


Figura 3. Representação gráfica da expressão de CD 11b, CD34, CD45, CD54, CD73, CD90, MHC-I e MHC-II das células-tronco mesenquimais em amostras previamente ao congelamento (pré), criopreservadas no meio A, meio B e meio C após diferentes tempos de congelamento (30, 60 e 90 dias).

O resultado referente a expressão dos marcadores incluindo dados de todas as replicatas das expressões médias da cultura em relação a cada proteína de superfície está ilustrado graficamente na figura 3 na forma de média \pm desvio padrão.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo das células após 30, 60 e 90 dias de congelamento foram comparados ao resultados previamente ao congelamento (Fig. 3). A análise demonstrou que não houve diferença estatística significativa na expressão dos marcadores, portanto o processo de congelamento com os meios testados não modificou a expressão dos marcadores celulares estudados nos tempos de 30, 60 e 90 dias.

Previamente ao congelamento e 90 dias de congelamento, as células foram submetidas as diferenciações *in vitro*, obtendo-se alterações morfológicas e da matriz extracelular (Fig. 4) condizentes com as diferenciações osteogênica, condrogênica e adipogênica, independente do meio de criopreservação.

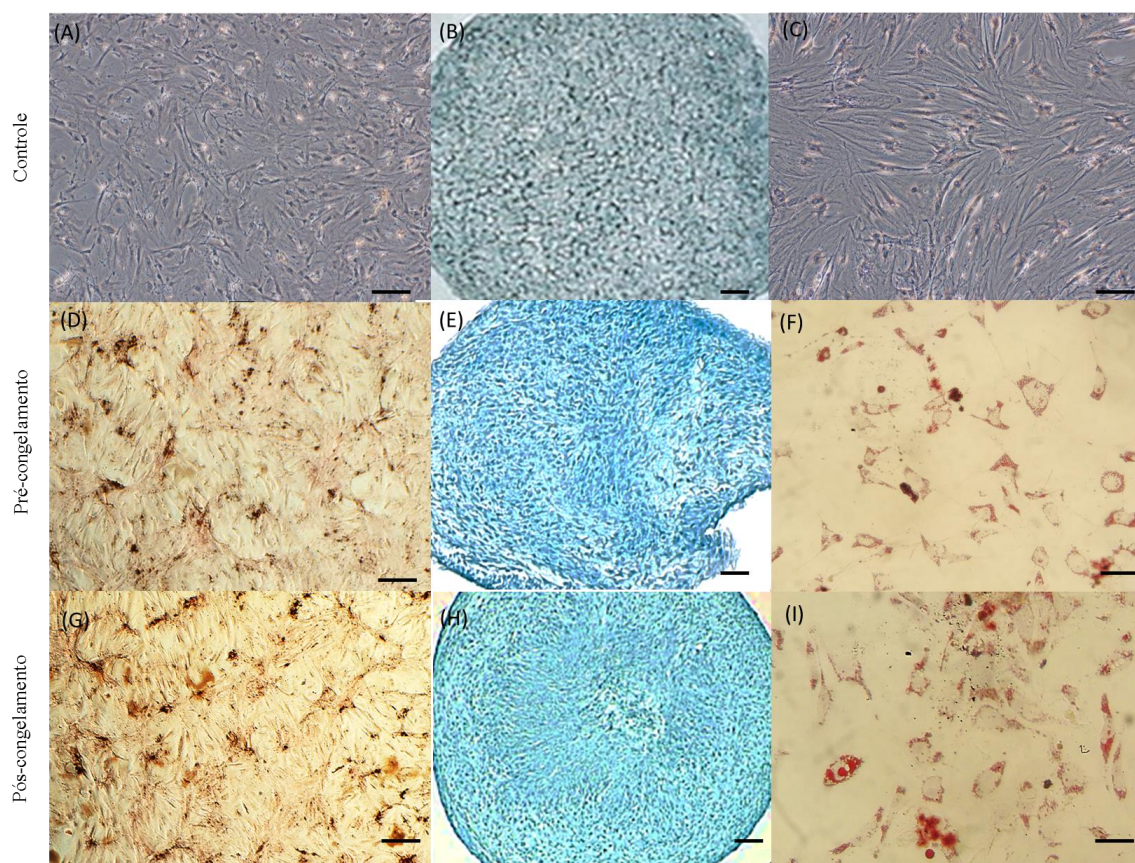


Figura 4. Fotomicrografia das culturas de CTM submetidas à diferenciação osteogênica (D e G), condrogênica (E e H) e adipogênica (F e I), previamente ao congelamento e após 90 dias de congelamento no meio A. Os controles negativos de cada diferenciação (A-C), realizados com os meio de cultura sem a suplementação específica são evidenciam ausência de diferenciação para comparação. Barra = 250 μ m.

A diferenciação osteogênica foi confirmada através da detecção de deposição de fosfato de cálcio na matriz extracelular (fig. 4D e G). A diferenciação em adipócitos foi confirmada a partir da coloração de OilRed O para visualização das gotículas de gordura intracitoplasmáticas coradas em vermelho (fig. 4F e I). A diferenciação condrogênica foi confirmada pela coloração

de Alcian Blue nos cortes histológicos dos *pellets* celulares formados durante o cultivo, evidenciando a presença de glicosaminoglicanas da matriz cartilaginosa (fig. 4E e H).

Criopreservação, descongelamento e viabilidade das CTM

As CTM provenientes do tecido adiposo de ratos Lewis eGFP+/+ após caracterização recomendada pela ISCT foram congeladas e estocadas à -80°C por no mínimo 30 dias e no máximo 90 dias em cada meio de criopreservação testado.

Previamente ao congelamento e imediatamente após o descongelamento, as células foram submetidas ao teste de viabilidade pela coloração de Azul de Tripam, que cora apenas as células com comprometimento da membrana citoplasmática. Os valores médios obtidos no teste de Azul de Tripam foram maiores que 70% em todos os meios de criopreservação testados. No tempo de 30 dias os valores de A (93,90±0,529), B (88,60±0,964) e C (88,06±1,563) foram superiores a 85% de células viáveis. O meio A apresentou diferença significativa em relação ao meio C no tempo de 30 dias. Com 60 dias de congelamento, A (84,86±0,814) e B (81,46±0,971) apresentaram viabilidade maior que 80% e C (78,53±1,167) menor que 80%. No último tempo de análise (90 dias), somente o meio A (81,83±3,723) apresentou média acima de 80%, ficando os meios B (72,93±2,411) e C (74,83±2,458) acima de 70%.

Ao se comparar o meio de criopreservação A como meio B foi obtido diferença significativa na viabilidade celular no tempo de 30 dias (P<0,01) e 90 dias (P<0,001), demonstrando que o meio A apresentava maior percentual de células vivas após o descongelamento. Comparativamente ao meio A, o meio C apresentou maior percentual de células mortas após o descongelamento em todos os tempos de avaliação (P<0,001). Não foram observadas diferenças estatísticas (P>0,05) entre os meios B e C quando analisados entre os diferentes tempos (Fig. 5).

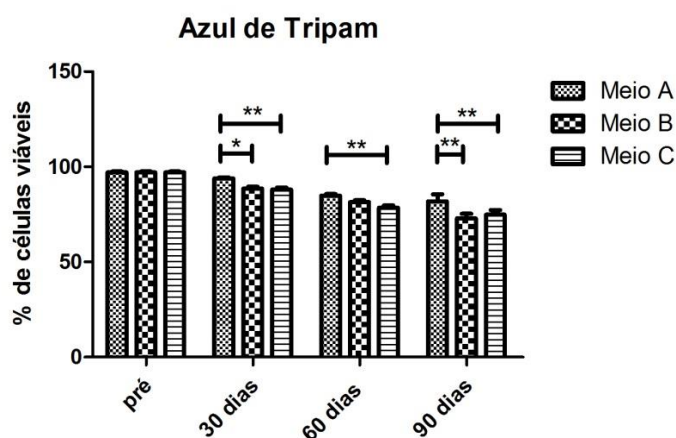


Figura 5. Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células viáveis no teste de Azul de Tripam nos tempos pré congelamento, 30, 60 e 90 dias. Os três meios de criopreservação foram analisados entre si nos diferentes tempos *P<0,01 e **P<0,001 quando comparados aos meios de criopreservação (ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni).

A análise pelo teste de Azul de Tripán dentro do mesmo grupo permitiu observar as diferenças estatísticas entre os tempos de congelamento (Fig. 6). A viabilidade das células preservadas no meio A não apresentou diferença estatística no tempo de 30 dias ($93,90 \pm 0,529$) quando comparada às células pré-congelamento ($97,03 \pm 0,493$), considerado tempo ideal de preservação das células neste meio. Com 60 e 90 dias de congelamento houve diferença estatística significativa ($P < 0,001$) da viabilidade celular. Os meios B e C apresentaram diferença estatística ($P < 0,001$) em todos os momentos de análise, quando comparados com as células pré-congelamento.

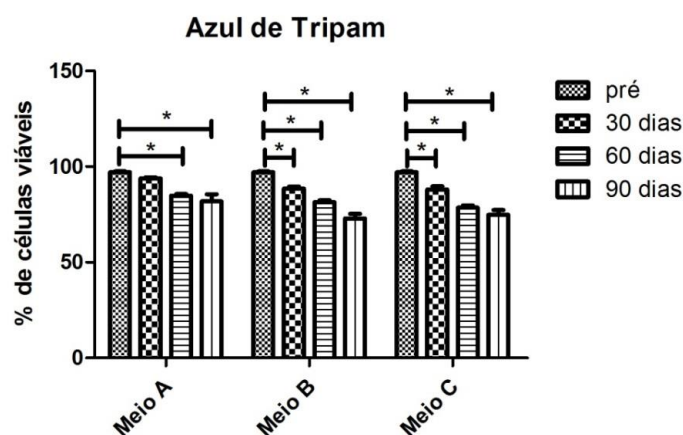


Figura 6. Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células viáveis no teste de Azul de Tripán demonstrando as diferenças encontradas dentro do mesmo grupo (meio de criopreservação). * $P < 0,01$ e ** $P < 0,001$ quando comparados ao meios de criopreservação (ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni).

No momento do congelamento e 48 horas após os descongelamentos nos tempos 30, 60 e 90 dias, as células foram plaqueadas para realização do teste com MTT (Fig. 7). Analisando os diferentes tempos dentro do mesmo grupo (meio de criopreservação), não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tempos nas células criopreservadas no meio A, enquanto nas células preservadas no meio B houve diferença a partir de 60 dias ($P < 0,01$) e no meio C a partir de 30 dias ($P < 0,01$), conforme ilustrado na figura 7.

Comparando os diferentes meios dentro do mesmo tempo, houve redução significativa da conversão dos cristais de formazan nas células criopreservadas no meio C em relação ao meio A já com 30 dias de congelamento, mantendo-se até 90 dias de congelamento. O meio B diferenciou do meio A no tempo de análise de 60 dias (Fig. 7F).

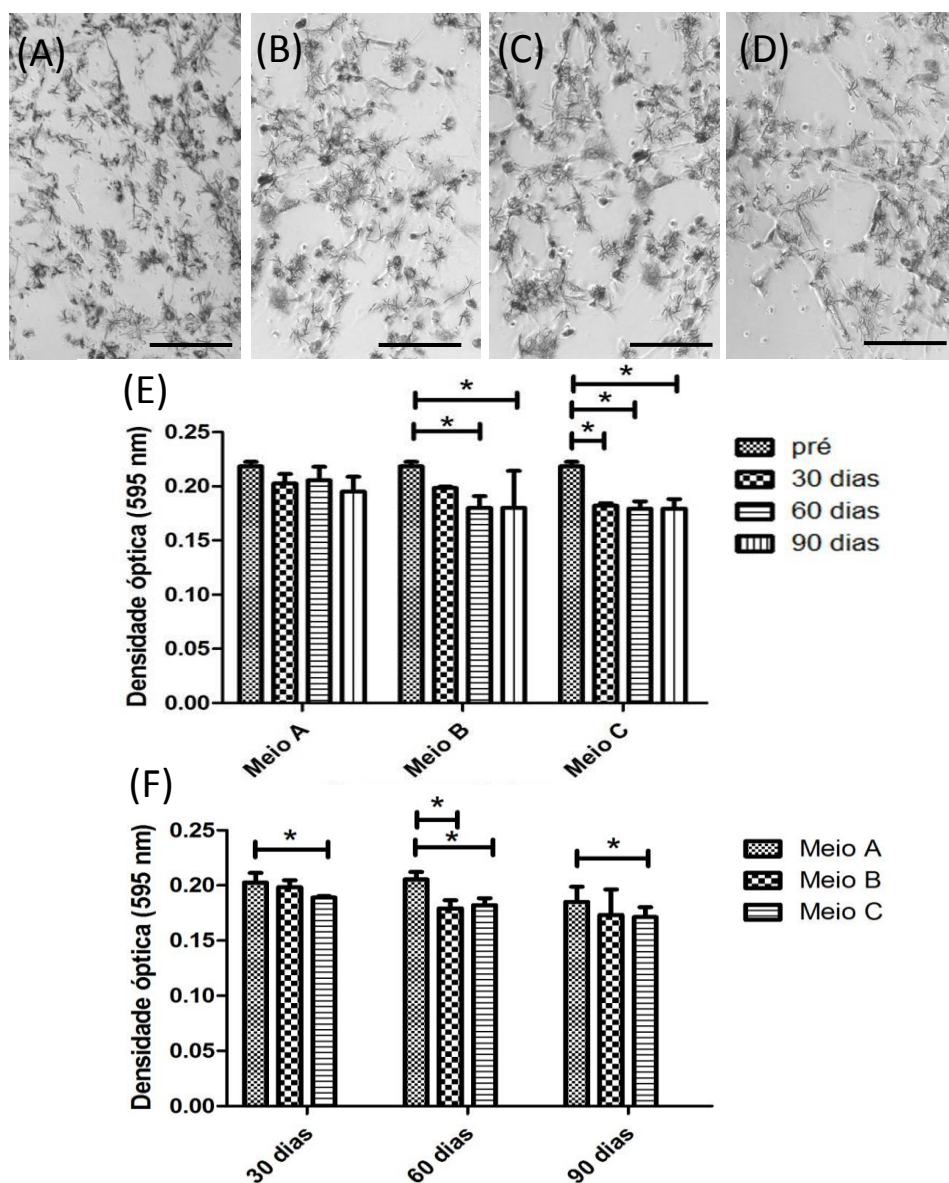


Figura 7. Viabilidade das CTM avaliada pelo ensaio de MTT nos diferentes meios de criopreservação. Visualização de cristais de formazan produzidos pelas CTM cultivadas previamente ao congelamento (A), 30 dias (B), 60 dias (C) e 90 dias após o congelamento no meio de criopreservação C. E) Representação gráfica da viabilidade celular das culturas previamente ao congelamento e 48 horas após o descongelamento nos diferentes grupos. F) Representação gráfica comparativa da viabilidade celular entre os meios nos diferentes tempos. * $P < 0,05$, quando comparados ao tempo pré-congelamento (ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni). Barra = $200\mu\text{m}$.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram um método simples e econômico de criopreservação de CTM que não afeta as características multipotentes e fenotípicas destas células, além de permitir alta viabilidade celular por até 90 dias. A criopreservação e formação de bancos de células congeladas destinadas à pesquisas de terapia celular se tornaram importantes com o maior desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos, sobretudo quando se tratam de células-tronco (Wang et al., 2007; Qi et al., 2008; Naaldijk et al., 2012). Devido à facilidade de isolamento, reprodutibilidade dos processos, abundância de células e a capacidade

de diferenciação das CTM isoladas do tecido adiposo, a criação de bancos celulares com estes isolados vem sendo pesquisada mundialmente (Renzi et al., 2012).

A técnica de coleta do tecido adiposo retroperitoneal demonstrou ser um método reprodutível e simples, assim como relatado por Zuk et al. (2001) e Bravo et al. (2012). Comparativamente aos métodos de obtenção de CTM da medula óssea, o isolamento de CTM do tecido adiposo apresenta maior custo devido à necessidade de digestão enzimática com colagenase tipo I realizada previamente ao plaqueamento inicial, no entanto a disponibilidade de CTM é maior, o que pode corresponder a 2% do lipoaspirado humano (Kingham et al., 2007) enquanto que a cada 100.000 células do estroma da medula óssea apenas uma (0,001%) pode ser considerada CTM (Caplan, 1991).

As células provenientes do tecido adiposo de ratos Lewis eGFP^{+/+} cresceram em monocamada e assumiram morfologia fibroblastóide, de acordo com o passo primordial para inclusão em cultura aderente e o primeiro critério requerido para categorizar o cultivo como de células-tronco mesenquimais (Dominici et al., 2006; Bourin et al., 2013).

Sinergicamente ao crescimento das pesquisas utilizando células congeladas, há a preocupação referente as possíveis alterações promovidas pela criopreservação às células-tronco (Naaldijk, et al., 2012), sobretudo alteração da capacidade de diferenciação (Wang et al., 2007; Qi et al., 2008; Naaldijk et al., 2012), embora o mecanismo exato dessa perda da pluripotência ou multipotência não esteja totalmente elucidado (Naaldijk et al., 2012). A alta expressão de marcadores de células-tronco e baixa expressão de marcadores de células hematopoiéticas observadas no presente estudo, confirmam o sucesso no isolamento das CTM a partir do tecido adiposo. Este padrão de expressão mundialmente aceito como etapa de caracterização das CTM (Dominici et al., 2006; Bourin et al., 2013) manteve mesmo após o congelamento das células por até 90 dias, sem significativa diferença das expressões de cada marcador independente do meio de criopreservação.

A alta expressão de MHC II observada tanto nas células previamente ao congelamento quanto após o congelamento está de acordo com o observado por Chen et al. (2009) que registraram incremento de até cinco vezes na expressão destas moléculas em CTM cultivadas quando comparadas a isolados frescos de tecido adiposo. A expansão *in vitro* promove o aumento de moléculas de MHC II o que pode representar um entrave no uso destas células, sobretudo em transplantes alogênicos (Chen et al., 2009; Tarte et al., 2010). Contudo, poucos registros correlacionam o insucesso de transplantes alogênicos com a rejeição às células devido a expressão elevada de MHC II (Liu et al., 2006; Wei et al., 2013).

Semelhante aos dados de Pollock e colaboradores (2015) a baixa expressão de CD11b/c, CD34, CD45, e elevada expressão de CD54, CD73 e CD90, comprovaram que a criopreservação não alterou a expressão fenotípica das células, independente do meio de criopreservação e do tempo de análise. Contudo, a criopreservação pode resultar em alterações do cariótipo sem modificar a expressão fenotípica das CTM (Sensebe et al., 2012; Pollock et al., 2015).

Em concordância com as recomendações do ISCT (Dominici et al., 2006; Bourin et al., 2013), as culturas apresentaram diferenciação *in vitro* em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, semelhante aos resultados prévios de Barry e Murphy (2004), Nardi e Meireles (2006), Boeloni (2012) e Sreejit (2012), não havendo interferência da criopreservação na capacidade de diferenciação das CTM. Adicionalmente, após o descongelamento, as CTM expandiram adequadamente com aderência à placa de cultura nas 48 horas após o

descongelamento. Estes resultados estão de acordo com o perfil proposto por Nardi e Meireles (2006) e aceito pela ISCT (Dominici et al., 2006; Bourin et al., 2013), caracterizando as células utilizadas nestes experimento como CTM, mesmo após a criopreservação por 90 dias.

As células mantidas por quatro semanas após o descongelamento, utilizadas nos protocolos de diferenciação, não apresentaram redução do número de células aderidas, mudanças na morfologia fibroblastóide, nem redução significativa da conversão de cristais de formazan pelo método de MTT no meio A. A senescência pós descongelamento previamente relatada por Francois et al. (2012) e Moll et al. (2014) não foi observada no tempo de acompanhamento das culturas após descongelamento. Há evidências que as CTM após criopreservação apresentam expansão em cultura com cinética de crescimento e atividade ATPase similares à de CTM não congeladas (Bruder et al., 1997; Mamidi et al., 2012; Darioli et al., 2013). Adicionalmente, as alterações do cariótipo parecem não afetar a proliferação das células após descongelamento (Pollock, et al., 2015).

Os resultados obtidos não demonstraram perda da capacidade de diferenciação e nem modificação do padrão fenotípico das CTM utilizadas no presente experimento, semelhante aos resultados de Balci e Can (2013) com CTM do cordão umbilical, Naaldijk et al. (2012) com CTM da medula óssea, Goh et al. (2007) e Liu et al. (2008), Thirumala et al. (2010), Renzi et al. (2012) com CTM do tecido adiposo. Adicionalmente a alta viabilidade celular mesmo após 90 dias de criopreservação a taxa de sucesso obtido com meio composto com menor quantidade de SFB, corroboram a importância dos estudos com criopreservação para terapia celular.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento, a criopreservação não altera as características imunofenotípicas das CTM a curto prazo (48 horas) após o descongelamento, bem como não influencia a multipotencialidade das CTM criopreservadas por período até 90 dias.

Os resultados obtidos estimulam a criação de bancos de CTM congeladas para realização de experimentos futuros com CTM criopreservadas. Por apresentar maior viabilidade celular quando comparado aos outros meios de criopreservação nos testes realizados, o meio de criopreservação A (composto por 50% de DMEM, 40% de SFB e 10% de DMSO) foi considerado o melhor meio de criopreservação dentre os analisados.

CAPÍTULO III

Efeitos imunomodulatórios e neuroprotetor de dois protocolos de tratamento com células-tronco mesenquimais criopreservadas em ratos com lesão espinal aguda.

INTRODUÇÃO

A recuperação do tecido nervoso da medula espinal e o restabelecimento de suas funções é alvo das pesquisas para tratamento da lesão espinal (Aras et al., 2016). Inúmeras estratégias terapêuticas visam melhorar a recuperação funcional após a lesão espinal, mas uma estratégia eficaz com possibilidade de aplicação clínica ainda é desconhecida (Bergman et al., 2000a; Quertainmont, et al., 2012). A complexidade das alterações que ocorrem no tecido nervoso após a lesão espinal indica a necessidade de uma abordagem multifatorial visando favorecer a proteção do tecido perilesional, o crescimento axonal e a recuperação funcional dos membros e funções autonômicas após lesão. Neste contexto o transplante de células-tronco mesenquimais (CTMs) tem resultado em melhorias da função locomotora e mudanças favoráveis na secreção de neurotrofinas e modulação da cicatriz glial em modelos experimentais (Quertainmont, et al., 2012). As CTMs podem ser obtidas com segurança da medula óssea e do tecido adiposo (Caplan, 1991; Zuk et al., 2001; Meirelles et al., 2008) e comprovadamente secretam fatores anti-apoptóticos, imunomodulatórios, pró-angiogênicos e fatores neuroprotetores (Dasari et al., 2007; Nandoe Tewarie et al., 2009; Ide et al., 2010; Cantinieaux et al., 2013; Mead et al., 2014; Aras et al., 2016).

Diferentes vias de administração das CTMs foram usadas para transplante de células após a lesão espinal e encefálica: intratecal (Kishk et al., 2010; Jia et al., 2014), intravenosa (Osaka et al., 2010; Quertainmont et al., 2012; Kim et al., 2013) ou intralesional (Roussos et al., 2005; Hu et al., 2010b). A aplicação intratecal permite que as células circulem com o fluxo do líquido cefalorraquidiano e tenham maiores chances de migrar para a área do SNC afetada, contudo por si só esta via apresenta potencial complicação (Karussis et al., 2010). O maior benefício da via intralesional é fornecer mais células (Dasari et al., 2007; Kim et al., 2013) e diretamente no local de ação, mas é necessário uma nova intervenção cirúrgica e a própria administração das células gera lesão no tecido nervoso (Paul et al., 2009; Guest et al., 2011; Whight et al., 2011; Shin et al., 2013). Apesar de questionada, a via intravenosa demonstrou não resultar em obstruções vasculares ou tumorigenicidade (Ra et al., 2011; Karussis et al., 2010). Além disso, diversas pesquisas com rastreamento das células comprovaram que as CTMs migram para a lesão do tecido nervoso (Syková e Jendelová, 2007; Carvalho, 2011; Aras et al., 2016). Os resultados com o uso da via intravenosa, o menor risco de danos à medula espinal com adoção desta via aliados à maior facilidade de transpor esta estratégia para aplicação clínica em animais e humanos, tornaram-na foco de maior utilização nas pesquisas com CTMs (Quertainmont, et al., 2012).

Há grande variação entre as publicações quanto ao número de células injetadas e a frequência das aplicações (Gao et al., 2016). O momento ideal para aplicação das CTM continua sob pesquisa, há trabalhos com administração nas primeiras horas (Carvalho, 2011), vinte quatro horas (Hu et al., 2010b), sete dias (Carvalho, 2011; Quertainmont et al., 2012; Jia et al., 2014) e semanas (Kim et al., 2013) após a lesão da medula espinal. Além de entender qual o melhor momento para o tratamento, emerge a necessidade de explicar se apenas um ou mais transplantes devem ser realizados (Gao et al., 2016). Os resultados encontrados em pesquisas com mais de uma aplicação de CTM em lúpus eritematoso (Gu et al., 2010), esclerose múltipla (Harris et al., 2012), doença do enxerto contra hospedeiro (Prasad et al., 2011; Hermann et al.,

2012) e lesão espinal (Jarocha et al., 2015) levantam a necessidade de avaliar os benefícios de mais de uma administração de CTM na lesão espinal.

Diferentes grupos de pesquisa utilizam o tratamento na fase aguda, o que requer disponibilidade de células em curto período de tempo para transplante. A criopreservação permite dispor de grande número de células em tempo hábil para utilização nos modelos experimentais (Choudhery et al., 2014; Minonzio et al., 2014). As CTM podem ser mantidas congeladas e manter sua capacidade de expandir em cultura, suas características morfológicas, expressão de marcadores de superfície e potencial de diferenciação (Choudhery et al., 2014; Dariolli et al., 2013; Minonzio et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi comparar dois protocolos de tratamento com CTMs criopreservadas, por via intravenosa, em ratos com lesão compressiva da medula espinal, avaliar os benefícios à recuperação funcional e os mecanismos de ação destas células.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), sendo iniciado após a aprovação sob protocolo de nº. 41/2012 (Anexo 1).

Foram utilizadas as instalações do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) e do Biotério Experimental do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG) para as etapas referentes à obtenção, cultivo, caracterização e armazenamento das CTM.

As instalações do Biotério Experimental do Centro de Experimentação de Pequenos Animais do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV) da Escola de Veterinária (EV) foram utilizadas para manutenção dos animais; a Sala de Cirurgia Experimental de Pequenos Animais do DCCV/EV para indução cirúrgica do trauma medular; o Laboratório de Patologia e Imunohistoquímica do Setor de Patologia Veterinária do DCCV/EV para processamento anatomohistopatológico; o Laboratório de Patologia Molecular do Setor de Patologia Veterinária do DCCV/EV para extração de RNA e processamento para reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR); o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Preventiva para a realização das reações de RT-qPCR.

A obtenção das imagens por ressonância magnética foi realizada no Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto Ressonância (CTPMAG) do Núcleo de Neurociências (NNC) do ICB.

Animais

Cento e setenta (170) ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, de oito semanas de idade, com massa corporal entre 300 e 350g provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CeBio) foram utilizados para indução da lesão compressiva da medula espinal. Previamente ao período experimental, os animais permaneceram por 30 dias de adaptação ao Biotério Experimental do Centro de Experimentação de Pequenos Animais do DCCV/EV/UFMG.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em caixas com quatro animais cada, em condições de umidade e temperatura controladas, fotoperíodo de 12 horas, alimentados com ração comercial para roedores³² e água *ad libitum*.

Grupos experimentais e delineamento experimental

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

- **Grupo Sham (GS):** os animais (n=20) foram submetidos à laminectomia e à introdução do cateter de Fogarty n.2 Fr., sem a realização da lesão espinal. Três horas após o procedimento foi administrado por via endovenosa 0,5 mL de salina fosfato tamponada (PBS 0,15M). Os animais foram distribuídos igualmente e aleatoriamente em cada tempo de avaliação: 24h (n=4), 48h (n=4), 72h (n=4), 8d (n=4) e 21d (n=4) após lesão espinal.

- **Grupo Controle (GC):** os animais (n=50) foram submetidos à laminectomia seguida do trauma medular compressivo e três horas após foi realizada aplicação intravenosa de 0,5 mL de PBS 0,15M. Os animais foram distribuídos igualmente e aleatoriamente em cada tempo de avaliação: 24h (n=10), 48h (n=10), 72h (n=10), 8d (n=10) e 21d (n=10) após lesão espinal.

- **Grupo tratado I (GI):** os animais (n=50) foram submetidos à laminectomia seguida do trauma medular compressivo e três horas após foi realizada aplicação intravenosa de 0,5 mL de solução PBS contendo 1×10^6 de CTM suspensas. Os animais foram distribuídos igualmente e aleatoriamente em cada tempo de avaliação: 24h (n=10), 48h (n=10), 72h (n=10), 8d (n=10) e 21d (n=10) após lesão espinal.

- **Grupo tratado II (GII):** os animais (n=50) foram submetidos à laminectomia seguida do trauma medular compressivo e três horas após foi realizada aplicação intravenosa de 0,5 mL de solução PBS contendo 1×10^6 de CTM suspensas. Sete dias após o trauma foi realizada nova aplicação intravenosa com as CTM na mesma concentração. Os animais foram distribuídos igualmente e aleatoriamente em cada tempo de avaliação: 24h (n=10), 48h (n=10), 72h (n=10), 8d (n=10) e 21d (n=10) após lesão espinal.

A avaliação neurológica foi realizada pela análise funcional dos membros pélvicos pelo método de Basso, Beattie e Bresnahan (1995). As amostras colhidas em cada tempo de análise foram divididas igualmente para avaliação histológica (morfológica e imunohistoquímica) e por RT-qPCR. Quatro animais de cada grupo foram acompanhados nos tempos 24 horas, oito dias e 21 dias por avaliação de imagem pela técnica de ressonância magnética.

Células-tronco mesenquimais criopreservadas e transplante celular

Foram utilizadas CTM provenientes do banco de CTM previamente confeccionado. As CTM foram criopreservadas em meio composto por 50% de DMEM, 40% SFB e 10% DMSO e mantidas entre 30 e 90 dias sob congelamento em freezer -80°C . As células foram descongeladas 48 horas antes do procedimento cirúrgico rapidamente (máx. 1min.) em banho-maria a 37°C e replaqueadas em garrafas de cultura contendo o meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM³³) com penicilina, estreptomicina e anfotericina B (PSA³⁴) sem soro

³² Labina® - Purina/Nestlé.

³³ DMEM high glucose with L-glutamine and without sodium bicarbonate - Sigma-Aldrich®.

³⁴ Antibiotic Antimycotic Solution 100x - Sigma-Aldrich®.

fetal bovino (SFB³⁵). As células foram mantidas entre 3 e 12 horas em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37° C.

Uma hora após a realização dos procedimentos cirúrgicos as células foram desprendidas com a tripsina, centrifugadas e ressuspensas em doses contendo 1,0 x 10⁶ células em volume total de 500µL de PBS 0,15M. As doses foram acondicionadas em *eppendorf* de 2mL sob refrigeração, e encaminhadas diretamente para aplicação intravenosa. O tempo máximo de espera para aplicação foi de três horas. Para caracterizar perda da viabilidade celular com o tempo de espera, doses extras foram confeccionadas e submetidas as mesmas condições de armazenamento, sendo avaliadas quanto à viabilidade celular pelo método do Azul de Tripán³⁶ imediatamente após a confecção das doses e 3 horas depois.

Três horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram cuidadosamente contidos para aplicação endovenosa. A veia lateral da cauda foi puncionada com um cateter 24G³⁷ em condições assépticas e foi administrado os diferentes tratamentos. Os grupos shan e controle (GS e GC) receberam 0,5mL de PBS 0,15M e os grupos tratados com CTM (GI e GII) receberam 1x10⁶ células suspensas 0,5mL de PBS 0,15M. O grupo tratado II (GII) recebeu nova aplicação de 1x10⁶ células suspensas 0,5mL de PBS 0,15M no sétimo dia após a lesão. Para este grupo, no quinto dia após a lesão foram descongeladas novas alíquotas de CTM seguindo o mesmo protocolo anteriormente descrito. Os animais dos demais grupos (GS, GC e GI) receberam administração de solução PBS 0,15M no sétimo dia.

Protocolo anestésico e procedimento cirúrgico

Os animais receberam analgesia preemptiva com morfina³⁸ (2,5mg/Kg) e antimicrobianoprofilaxia com cefalexina³⁹ (60mg/Kg), ambos por via subcutânea. A indução anestésica foi realizada por inalação passiva de 4,0% de isoflurano⁴⁰, e os animais foram mantidos em 2,0% de isoflurano durante o procedimento cirúrgico, fornecido por meio de máscara facial em sistema semiaberto.

A tricotomia, a antisepsia com polivinilpirrolidona degermante⁴¹ e álcool iodado⁴² foi realizada no dorso do animal, estendendo-se da região cervical até o sacro. Ambos procedimentos foram realizados com os animais já anestesiados. Após posicionamento dos panos de campo, foi realizada incisão cutânea com lâmina de bisturi n.10, de 4cm de extensão na linha sagital mediana, tendo como referência os processos espinhosos da oitava vértebra torácica (T8) e a primeira vértebra lombar (L1). Após divisão do tecido subcutâneo, as inserções musculares epiaxiais foram incisadas e os músculos afastados lateralmente. Com auxílio de uma perfuratriz pneumática⁴³ foi realizada laminectomia da décima (T10) e décima primeira (T11) vértebras torácicas. A medula espinal foi exposta e avaliada quanto a integridade macroscópica da dura mater e do parênquima neural. Posteriormente, um cateter de Fogarty n.2 Fr⁴⁴ foi introduzido no espaço epidural e conduzido cranialmente até o segmento medular T8-T9, conforme descrito por Vanicky et al. (2001). O *cuff* do cateter foi insuflado com 30µL de solução salina estéril e

³⁵ Fetal Bovine Serum, qualified, US origin - Gibco®

³⁶ Azul de Tripán - Sigma-Aldrich®.

³⁷ BD Insyte™ Autoguard™, BD, SP, Brasil.

³⁸ Dimorfi® solução injetável (1mg/ml) – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil.

³⁹ Rilexine® 150 injetável, - Virbac

⁴⁰ Isoflorine® - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil.

⁴¹ Riodene, PVPI-I, Rioquímica Indústria Farmacêutica, Brasil.

⁴² Riodene, Álcool Iodado, Rioquímica Indústria Farmacêutica, Brasil.

⁴³ ECCOS - Aesculap®, B. Braun, Brasil.

⁴⁴ Cateter Fogarty n.2, 60cm comp. para embolectomia arterial - Edwards Lifesciences®, EUA.

mantido desta forma por cinco minutos, realizando a lesão compressiva aguda. Em seguida o *cuff* foi esvaziado e o cateter removido do espaço epidural, seguindo a aproximação da musculatura paravertebral com fio Caprofil® 3-0⁴⁵ em padrão simples contínuo, redução do espaço morto em padrão simples contínuo com mesmo fio e dermorráfia com fio Mononylon® 3-0⁴⁶ em padrão simples separado.

Durante a recuperação anestésica, os animais permaneceram em câmara oxigenada com aquecimento por bolsas de água quente. Foram administrados solução NaCl a 0,9% na taxa de manutenção (15mL/kg), via subcutânea e morfina (5mg/kg/SC) pela mesma via. A analgesia pós-operatória foi mantida durante três dias com tramadol⁴⁷ (2mg/kg/SC), a cada 12 horas. Realizou-se massagem abdominal para esvaziamento vesical a cada oito horas, até o retorno da micção voluntária. Os animais foram monitorados quanto à presença de secreção ou sinais de infecção da ferida cirúrgica por 10 dias, sinais de infecção urinária, e uremia por 21 dias.

Avaliação neurológica

A avaliação neurológica foi executada um dia antes do procedimento cirúrgico, 24 horas, 48 horas e 72 horas após e a cada sete dias até completar um período de 21 dias. O método utilizado para avaliação motora foi o da Escala de Basso, Beatie e Bresnahan (BBB) descrito por Basso et al. (1995), que atribui uma pontuação de zero a 21 de acordo com a movimentação dos membros pélvicos, cauda e sustentação do corpo (Anexo 2). A avaliação prévia (24 horas antes do procedimento cirúrgico) objetivou excluir animais com alterações locomotoras pré-existentes que influenciariam os resultados.

As pontuações da escala foram realizadas por dois avaliadores que desconheciam os grupos aos quais os animais pertenciam (estudo cego), através da análise de vídeos individuais dos animais com tempo de 2 minutos/análise. As filmagens foram feitas em campo aberto circular de um metro de diâmetro. Um minuto antes de se iniciar a captura das imagens, os animais foram mantidos no campo aberto para adaptação. O campo foi limpo a cada troca de animal, evitando influências por odores ou secreções. Os avaliadores foram previamente informados e treinados no teste de BBB e submetidos ao teste de concordância e reciprocidade do avaliador nas etapas de treinamento

Obtenção de imagens por ressonância magnética

Quatro animais de cada grupo experimental foram submetidos à avaliação por ressonância magnética nos tempos 24 horas, 8 e 21 dias. Os animais foram anestesiados em câmara anestésica com 4,0% de isofluorano e mantidos com 2,0% de isofluorano durante o exame.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, sendo fixado um marcador de água sobre a ferida cirúrgica objetivando obter um correto posicionamento para captura das imagens na região da coluna torácica, a qual foi centralizada no *grant*. Uma bolsa de água quente foi mantida em contato indireto com a cauda do animal para impedir a hipotermia durante o exame. Após o posicionamento correto, a aquisição de imagens foi realizada na ponderação T1, sendo obtidas 30 imagens de 0,1mm de espessura em comprimento total de 3,0 cm da medula espinal.

⁴⁵ Poliglecaprone 25 - Carprofyl - Ethicon/Johnson&Johnson®.

⁴⁶ Nailon monofilamentar - Mononylon - Ethicon/Johnson&Johnson®.

⁴⁷ Cloridrato de tramadol, 10mg/mL - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil.

Eutanásia

No 8º e 21º dias após o procedimento cirúrgico, dez (10) animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico⁴⁸ (100mg/kg), por via intraperitoneal, seguida de punção cardíaca com retirada de sangue. Imediatamente após a eutanásia, a coluna vertebral foi dissecada e seccionada na altura do plexo braquial e da articulação lombossacra. Os processos espinhosos e o arco dorsal foram cuidadosamente removidos para exposição da medula espinal. Metade das amostras foi destinada à avaliação histopatológica e imunohistoquímica e a outra metade foi utilizada para avaliação da expressão gênica das citocinas e fatores neurotróficos. Nos animais destinados à avaliação da expressão gênica, um segmento de 1,5cm da medula espinal centralizado no epicentro foi retirado. As amostras de medula foram colocadas em criotubo RNase e DNase *free* com 1ml de trizol⁴⁹ e maceradas com auxílio de um pinça hemostática estéril. Os criotubos foram então congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados em freezer⁵⁰ a -80°C. Nos demais, um segmento de 2,5cm da medula espinal, centralizado no epicentro da lesão macroscópica foi removido do canal medular e fixado em solução refrigerada (4°C) de paraformaldeído 4% tamponado em pH 7,2, por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram transferidas para solução de álcool 70º e processadas pela técnica de rotina para inclusão em paraplant⁵¹.

Avaliação anatomohistopatológica e imunohistoquímica

Previamente a inclusão, as amostras de medula foram seccionadas em três partes iguais (0,8cm) e identificadas como cranial, epicentro e caudal. Os segmentos medulares foram submetidos a cortes transversais, sequenciais, de 3,0µm de espessura e montados em lâminas previamente gelatinizadas para avaliação histopatológica e imunohistoquímica. Iniciou-se com a retirada de quatro cortes de quatro micrômetros cada, que foram distribuídos em duas lâminas gelatinizadas, dois cortes por lâmina. Em seguida, 500µm foram desbastados e mais quatro cortes foram obtidos e colocadas em duas lâminas, assim sucessivamente, até o final da área de lesão. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e observadas à microscopia óptica.

Para descrição histopatológica foram selecionadas duas secções histológicas por animal contendo área de necrose focalmente extensa no funículo dorsal, uma proveniente da região cranial e a outra da região caudal ao epicentro da lesão. As secções foram observadas em microscopia óptica com coloração de hematoxilina-eosina e as alterações foram descritas por avaliador que desconhecia os grupos e tratamentos.

Para realização das reações de imunohistoquímica padronizou-se a utilização das primeiras secções do segmento caudal contendo área de necrose focalmente extensa no funículo dorsal. Nos animais do grupo sham tanto para análise histopatológica descritiva quanto para imunohistoquímica utilizaram-se secções provenientes da região correspondente ao epicentro. Foi avaliado uma lâmina por animal para cada anticorpo.

Foram utilizados os anticorpos primários: anti-CD68 (1:200)⁵² para avaliação de células da microglia ativadas e macrófagos; anti-NeuN (1:500)⁵³ para avaliação de corpos neuronais; anti-

⁴⁸ Thiopentax® - Cristália.

⁴⁹ Trizol, Invitrogen, Life Technologies, USA.

⁵⁰ Revco DxF, Thermo Fisher Scientific, USA.

⁵¹ Paraplant plus – Sigma-Aldrich®.

⁵² Anti-CD68 (ED), Abcam, EUA.

⁵³ Anti-NeuN, Chemicon Temecula, EUA.

GFAP (1:200)⁵⁴ para avaliação de prolongamentos de astrócitos, e anti-eGFP (1:1500)⁵⁵ para identificar as CTM transplantadas. Cortes controles, com substituição do anticorpo primário por IgG, foram realizados em todas as reações para verificar a especificidade da marcação.

As secções foram colocadas em xilol para serem desparafinadas e em seguida hidratadas em concentrações decrescentes de álcool. Foi realizada recuperação antigênica por meio de aquecimento das secções por 40 minutos em solução de ácido cítrico a 0,05% (20 minutos em banho maria e 20 minutos em repouso na mesma solução); em seguida, o bloqueio das peroxidases endógenas em solução de metanol e peróxido de hidrogênio (0,3% H₂O₂), por 30 minutos, em câmara escura. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados por 30 minutos com solução bloqueio⁵⁶ também em câmara úmida e escura para bloqueio de epítomos inespecíficos. Na sequência, as secções histológicas foram incubadas *overnight*, na câmara úmida e escura, a 4°C, com os anticorpos primários. Cortes controles, com omissão do anticorpo primário, foram realizados em todas as reações para verificar a especificidade da marcação. No dia seguinte, após lavagem com PBS o anticorpo secundário⁵⁷ foi adicionado, e os cortes incubados por 45 minutos. Acrescentou-se o complexo estreptoavidina biotina peroxidase⁵⁸ e foi novamente incubado por mais 30 minutos. As reações foram reveladas com 3-3' diaminobenzina peroxidase (DAB)⁵⁹ lavadas em água corrente por 10 minutos, e contra coradas com hematoxilina de Harris. Após estas etapas, procederam-se a desidratação padrão, e montagem das secções com lamínulas e bálsamo do Canadá.

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

Avaliação da expressão relativa das citocinas e fatores neurotróficos

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

Foi realizada a extração do RNA total de cada amostra pela técnica do Trizol. As amostras foram descongeladas, transferidas para um tubo cônico e maceradas com auxílio de pistilo plástico estéril livre de RNA e DNA. Após a maceração, as amostras foram incubadas por 5 minutos, seguindo-se a adição de 200 μ L de clorofórmio e agitação vigorosamente por 15 segundos. Os tubos foram incubados por mais 5 minutos sob refrigeração e centrifugados a 11400 rpm por 15 minutos, a 4 °C, para separação das três fases. A fase aquosa (transparente) foi transferida para novos tubos, e foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico para precipitação do RNA. As amostras foram congeladas a -80°C por 30 minutos. Após esse período as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 11400 rpm por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi hidratado com 1000 μ L de etanol a 75%. As amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram secos a temperatura ambiente por 5 minutos e depois solubilizados em 20 μ L de

⁵⁴ Anti-GFAP, Abcam, EUA.

⁵⁵ Anti-EGFP, Abcam, EUA.

⁵⁶ Protein Block(Serum Free), DAKO, EUA.

⁵⁷ LSAB™, Link for AP/HRP, DAKO, EUA.

⁵⁸ LSAB™, Streptavidin/HRP, DAKO, EUA.

⁵⁹ DAB, DAKO, EUA.

água ultra-pura DEPC⁶⁰ mantidas por 10 minutos a 55°C. As amostras foram congeladas a -80°C para posterior síntese do DNA complementar (cDNA). A quantificação do RNA foi feita por espectrofotometria de luz UV utilizando-se a diluição 1:50 ou seja 2µL RNA total foi diluído e 98 µL de água DEPC, as amostras foram lidas na absorbância 260/280 nm.

A confecção do cDNA foi realizada por meio da reação da transcriptase reversa, utilizando-se *Kit* comercial⁶¹. O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 µg de RNA total, sendo adicionados, em cada amostra, reagentes desse *Kit*, incluindo 10 µL de 2xRT, 2 µL de RT e água (até completar 8 µL com o RNA), em um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas em termociclador, sendo os ciclos de 25 °C por 20 minutos, 42 °C por 50 minutos e 85 °C por 5 minutos. A seguir, adicionou-se 1,0µL de RNase H, e as amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram congeladas a -20°C, até a realização da reação em cadeia de polimerase em tempo real.

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

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

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com o kit comercial *Power Syber green*⁶², utilizando-se 2,5µg de cDNA, 5pM de cada iniciador e 12,5µL do reagente syber Green em um volume final de 25µL de reação por poço, no aparelho *7500 Real Time PCR Sistem* (Applied Biosystems, USA). Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos, 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Os *primers* foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tab. 1). A expressão gênica foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *Rattus norvegicus*. Os níveis de expressão obtidos no grupo

⁶⁰ Ultra-pure® DEPC-treated water, Gibco, Invitrogen, USA.

⁶¹ SuperScript® III, Platinum® Two-Step qRT-PCR, Invitrogen, USA.

⁶² Power SYBR® Green PCR Master Mix, Invitrogen, USA.

shan foram utilizados como padrão de expressão no cálculo da expressão relativa de cada transcripto.

Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro grupos experimentais, e cinco tempos de avaliação, totalizando 20 tratamentos. Verificou-se a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk e as variâncias comparadas pelo teste F. Os dados que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [$x=\log(y+1)$]. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para comparação entre as médias de expressão gênica e de densidade integrada de pixels entre os grupos experimentais, em um tempo de avaliação, os dados foram analisados pelo Teste t não pareado. Os escores da avaliação da capacidade motora foram comparados entre os grupos, pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Células-tronco mesenquimais criopreservadas e transplante celular

As células-tronco mesenquimais (CTM) utilizadas neste estudo foram oriundas de um banco de CTM isoladas de tecido adiposo de ratos Lewis transgênicos para a proteína verde fluorescente (eGFP) e criopreservadas entre 30 e 90 dias. As células utilizadas foram previamente avaliadas e apresentaram os critérios mínimos exigidos pelo ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) e, portanto, foram utilizadas no presente experimento.

Três horas após o preparo das doses em eppendorfs, as CTM submetidas à avaliação de viabilidade pelo Azul de Tripán demonstraram manutenção da viabilidade celular acima de 80%. Houve redução significativa da viabilidade celular três horas após a confecção das doses (tempo 0 = $95,26\pm 4,54$; tempo 3 horas = $87,83\pm 2,41$) (Fig.1) ($P<0,05$).

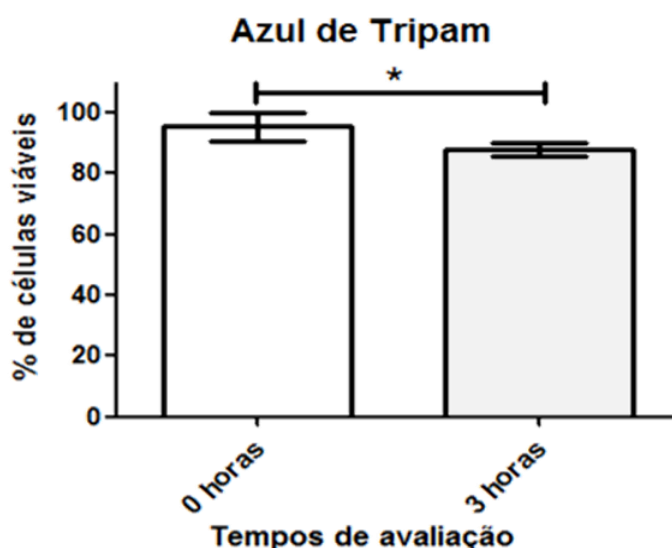


Figura 1. Representação gráfica da média e desvio padrão da porcentagem de células viáveis no teste de Azul de Tripán entre os tempos de análise. O teste foi realizado logo após o preparo das doses para transplante (0 horas) e três horas após o preparo. * $P<0,015$.

Protocolo anestésico e procedimento cirúrgico

Os animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos não apresentaram alterações comportamentais ou de apetite condizentes com dor, sendo este fato atribuído à adequada analgesia preemptiva e pós-operatória realizada com morfina e cloridrato de tramadol.

No pós-operatório imediato, nenhuma alteração clínica foi observada, no entanto com 24 horas após os procedimentos cirúrgicos 78,6% (n=118) animais submetidos ao trauma espinal (n=150) apresentaram hematúria e 100% dos animais submetidos ao trauma apresentaram retenção urinária. A retenção urinária se caracterizou por distensão acentuada da bexiga à palpação abdominal e dificuldade de esvaziamento vesical com micção em jatos durante a massagem vesical. Os animais submetidos apenas à laminectomia (GS) não apresentaram disfunções urinárias, contudo foram submetidos às mesmas manobras para esvaziamento vesical com intuito de uniformizar os estímulos externos nos animais do experimento.

A hematúria permaneceu por três dias em 70,0% (n=105) dos animais e por até sete dias em 8,6% (n=13) dos animais submetidos ao trauma. A retenção urinária permaneceu por cinco dias em 90,6% (n=136) dos animais, sete dias em 6,6% (n=10) e perdeu por 10 dias em três animais submetidos ao trauma. Não houve relação estatística entre as alterações urinárias e os grupos avaliados, sendo observada as alterações pós-operatórias de forma homogênea entre os grupos nos primeiros 7 dias. Dos três animais que mantiveram a retenção urinária por 10 dias, dois pertenciam ao grupo controle e um ao grupo GII, contudo não foram estabelecidas correlações entre as alterações e os grupos de tratamento.

A ferida cirúrgica foi monitorada por 10 dias e os pontos de pele foram retirados ao final do período de observação. Nenhum curativo foi confeccionado para proteger a ferida cirúrgica visto a experiência prévia no projeto piloto, que demonstrou que os animais de uma mesma gaiola interviam mais nas feridas dos outros quando haviam curativos sobre as mesmas.

Dos 170 animais submetidos à cirurgia, 25,8% (n=44) apresentaram aumento de volume de consistência mole a flutuante na região da ferida cirúrgica 24 a 48 horas após a cirurgia, sendo considerado o mesmo como seroma. O mesmo foi drenado através de punção com agulha de 22G sob condições de assepsia e se resolveu completamente em 72 horas após a cirurgia.

Ocorreu deiscência dos pontos de pele e abertura da ferida cirúrgica nas primeiras 48 horas em 7,05% (n=12) dos animais, os quais foram submetidos à limpeza da ferida cirúrgica e nova dermorrafia com o mesmo padrão e fios utilizados na primeira técnica. Todos os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano para realização destes procedimentos. Quatro animais apresentaram nova deiscência dos pontos e a ferida cirúrgica foi cicatrizada por segunda intenção, com limpeza da ferida por solução fisiológica e solução de clorexidina a 2,0% três vezes ao dia até a cicatrização completa. A deiscência dos pontos foi atribuída à intervenção dos animais presentes na mesma caixa. Em nenhum dos animais, mesmo naqueles que tiveram deiscência dos pontos de pele ou formação de seroma, foram observados sinais de infecção da ferida cirúrgica.

Avaliação neurológica

Todos os animais, independente do grupo, foram avaliados 24 horas antes do procedimento cirúrgico para exclusão de animais com alterações prévias ao estudo, que influenciariam os resultados obtidos. Os 170 animais do presente estudo apresentaram escore máximo (21) na

avaliação BBB antes do procedimento cirúrgico. Os resultados das médias \pm desvio padrão estão representados na fig. 2, em cada tempo de avaliação. Não foram observados fatores estressores na realização do teste BBB, o que foi atribuído à ampla exploração do campo aberto durante a execução do teste e a ausência de pausa da locomoção.

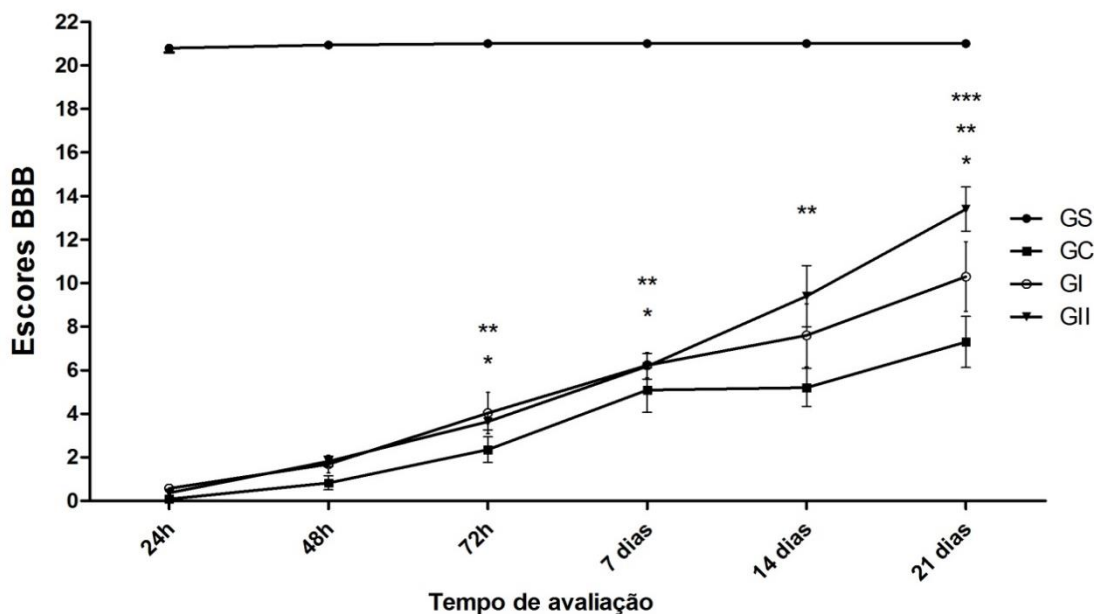


Figura 2. Representação gráfica da avaliação neurológica através da escala de escores da função motora proposta por Basso, Beatie e Bresnahan (BBB) durante os 21 dias de avaliação. Foi observada diferença significativa entre os grupos tratados (Kruskal Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's) sendo representada por (*) quando GI difere de GC ($p < 0,05$), (**) quando GII difere de GC ($p < 0,05$) e (***) quando GII difere de GI ($p < 0,05$). As diferenças com o grupo shan não foram representadas no gráfico.

Os animais do GS obtiveram escore máximo (Fig.2) em todos os tempos de avaliação e apresentaram diferença ($p < 0,001$) com todos os grupos durante o período analisado. Todos os demais grupos obtiveram escore mínimo (0 à 2) na avaliação BBB após 24 horas da indução da lesão espinal (Fig.2). Não houve diferença significativa entre os escores obtidos nos grupos GC, GI e GII nos tempos de avaliação 24 horas (GC: $0,60 \pm 0,55$; GI: $0,47 \pm 0,63$; GII: $0,36 \pm 0,50$) e 48 horas (GC: $1,50 \pm 0,99$; GI: $1,25 \pm 1,252$; GII: $1,81 \pm 0,75$).

Os grupos GI e GII diferiram estatisticamente do GC nos tempos 72 horas (GC: $2,35 \pm 1,58$; GI: $4,03 \pm 2,51$; GII: $3,63 \pm 1,02$), 7 dias (GC: $5,09 \pm 2,19$; GI: $6,23 \pm 1,22$; GII: $6,18 \pm 1,25$) e 21 dias (GC: $7,30 \pm 1,63$; GI: $10,30 \pm 2,23$; GII: $13,40 \pm 1,40$). No tempo de 14 dias, apenas o grupo GII ($9,34 \pm 1,94$) apresentou diferença estatística com o GC ($5,20 \pm 1,22$). Não houve diferença estatística entre os grupos GI e GII nos tempos de 24 horas, 48 horas, 72 horas e 7 dias. Por terem recebido apenas uma aplicação de CTM até este momento, não se esperava encontrar diferenças estatísticas entre os mesmos. Com 21 dias, o grupo GII diferiu do grupo GI (GI: $10,30 \pm 2,23$; GII: $13,40 \pm 1,40$ - $p < 0,05$) e apresentou uma recuperação da função motora significativamente melhor do que os GC (GC: $7,30 \pm 1,63$; GII: $13,40 \pm 1,40$ - $p < 0,01$), evidenciando que o tratamento com duas aplicações de CTM promove melhor recuperação da função motora nas condições do presente estudo (Fig.2).

Obtenção de imagens por ressonância magnética

As imagens por ressonância magnética foram obtidas em cortes transversais na ponderação T1 (Fig.3). Nos procedimentos para aquisição da imagem por ressonância magnética houve dificuldade para manutenção da temperatura corporal dos animais mesmo com os cuidados de manter as partes do corpo fora do *grant* sob bolsas térmicas aquecidas. Todos os animais apresentaram hipotermia e tiveram tempo de recuperação anestésica maior (20 ± 8 minutos), quando comparado ao tempo de recuperação pós-cirúrgica (12 ± 5 minutos). Houve óbito de um animal do grupo GI durante a realização da ressonância magnética.

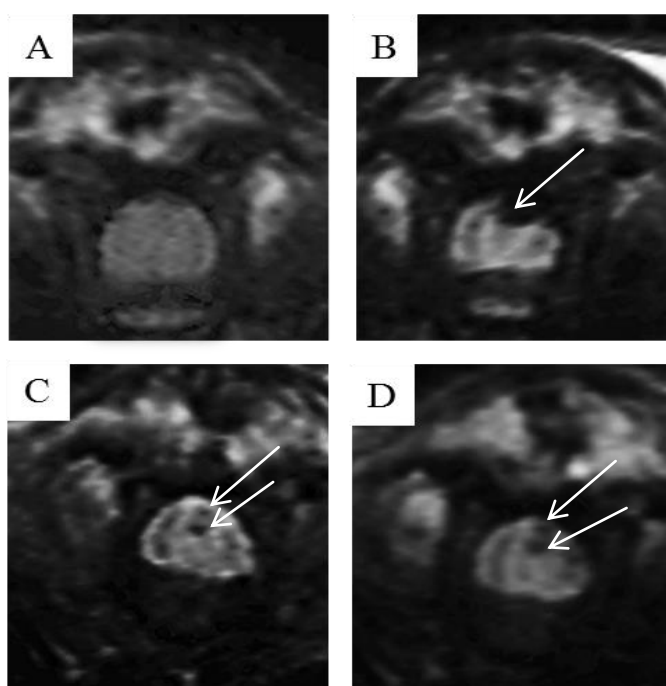


Figura 3. Imagens ponderadas em T1 obtidas por ressonância magnética da medula espinal de ratos Wistar no 21º dia após o trauma espinal. Seção transversal da medula espinal de animal do grupo GS, sem lesão no tecido nervoso (A). B) Seção transversal da medula espinal de animais com lesão circunscrita de hiposinal (seta) na região dorsal do tecido nervoso do grupo GC e dos grupos GI (C) e GII (D).

O tempo médio da aquisição das imagens foi de 45 minutos (± 3 min.), tempo no qual não era possível realizar nenhuma monitoração anestésica, pois os animais ficavam completamente dentro do aparelho e sem janelas para acesso.

Na avaliação por ressonância magnética foi possível identificar o local da lesão nos diferentes grupos, contudo a localização da lesão na região torácica caudal não permitiu adequada aquisição de toda extensão da imagem devido a movimentação respiratória dos animais. Mesmo com a maior vaporização segura possível (3%) de isofluorano, a movimentação do tórax impediu adequada aquisição das imagens. Nas imagens obtidas por cortes transversais (coronais) ponderados em T1, sem os artefatos da respiração, foram identificadas áreas hipointensas circunscritas no funículo dorsal de todos os animais dos grupos GC, GI e GII (Fig 3B-D). O mesmo não foi observado nos animais do grupo GS em todas as imagens obtidas, caracterizando ausência de lesão em toda a extensão do tecido nervoso da medula espinal avaliada (Fig. 3A). Devido ao tamanho do *grant* do aparelho não foi possível realizar aquisição com os cortes longitudinais ou sagitais.

A soma dos artefatos de imagem devido a respiração dos animais e a impossibilidade de obtenção de cortes adicionais ao transversal, bem como de imagens ponderadas em T2, impediu a mensuração do tamanho da lesão pela técnica de ressonância magnética.

Avaliação anatomohistopatológica

O grupo GS apresentou preservação da arquitetura do tecido nervoso na análise das secções das medulas espinais sob microscopia de luz. Nas secções dos animais deste grupo observou-se a medula de morfologia arredondada, envolvida pelas meninges, contendo a substância cinzenta em formato de “H” com completa visibilização dos cornos dorsais e ventrais de cada antímero, presença do canal endimário de formato arredondado no centro do “H medular”, substância branca circundando a substância cinzenta e nitidamente organizada nos funículos dorsais, ventrais e laterais (Fig.4A). Os sulcos intermédios dorsais esquerdo e direito e os septos intermédios delimitando os fascículos grácil e cuneiforme de cada antímero, bem como a fissura mediana ventral com a artéria espinal ventral estavam nítidos em todas as secções (Fig.4A). As raízes dorsais e ventrais dos nervos de cada antímero estavam presentes nas lâminas (Fig.4A). Os corpos neuronais observados na substância cinzenta estavam íntegros e apresentando núcleo, nucléolo e substância de Nissl evidentes (Fig.4B). Os axônios e a bainha de mielina estavam íntegros e sem sinais de vacuolização em todos os funículos. A evidência destas características morfológicas no grupo GS demonstraram que a realização de laminectomia e a passagem do cateter de Fogart sem o enchimento do *cuff* não provocou lesão na medula espinal.

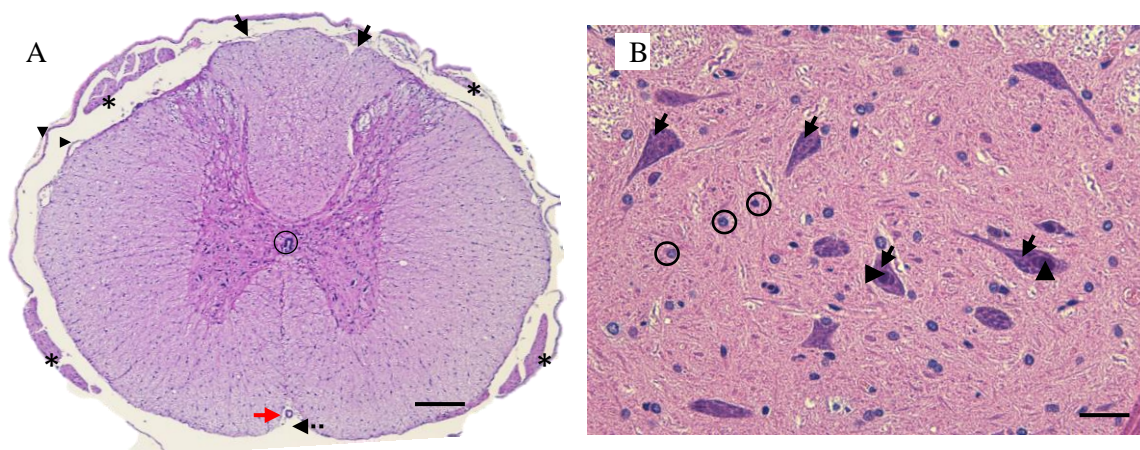


Figura 4. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinais de ratos Wistar do grupo sham (GS) oito dias após a laminectomia utilizada para acesso ao canal vertebral: A) Medula espinal de animal submetido à laminectomia na qual observa-se a arquitetura do tecido nervoso preservada com substância cinzenta em nítido “H” medular e substância branca na periferia, meninges íntegras (cabeças de setas pretas), canal endimário (círculo), sulco intermédio dorsal (setas pretas), fissura mediana ventral (seta pontilhada), artéria espinal ventral (seta vermelha) e raízes nervosas dorsais e ventrais (asteriscos). A substância branca está íntegra em todos os funículos; B) Neurônios íntegros com substância de Nissl (seta), núcleos e nucléolos evidentes (cabeças de setas), células da glia (círculos). Coloração HE; A: Barra = 285 µm; B: Barra = 35 µm.

Os grupos submetidos ao trauma medular compressivo apresentaram lesão do tecido nervoso com características semelhantes entre si. Nos cortes dos segmentos craniais encontraram-se secções de medula íntegra e, ao seguir caudalmente, notaram-se regiões de malácia (cavitações) focais. No aspecto craniocaudal, as cavitações ocupavam a região do funículo dorsal nas primeiras lâminas (Fig. 5A, 5D e 5G) e nos subsequentes foram expandindo-se até acometer toda a substância branca e cinzenta (epicentro da lesão). Caudalmente ao epicentro, verificou-se

processo inverso, com redução da área de cavitação (Fig. 5C, 5F e 5I). Não houve diferença nas alterações histológicas observadas na região do epicentro dos grupos GC, GI e GII, nos tempos de avaliação oito e 21 dias. Nessa região as medulas apresentaram malacia difusa intensa acometendo toda substância branca e cinzenta (Fig. 5B, 5E e 5H).

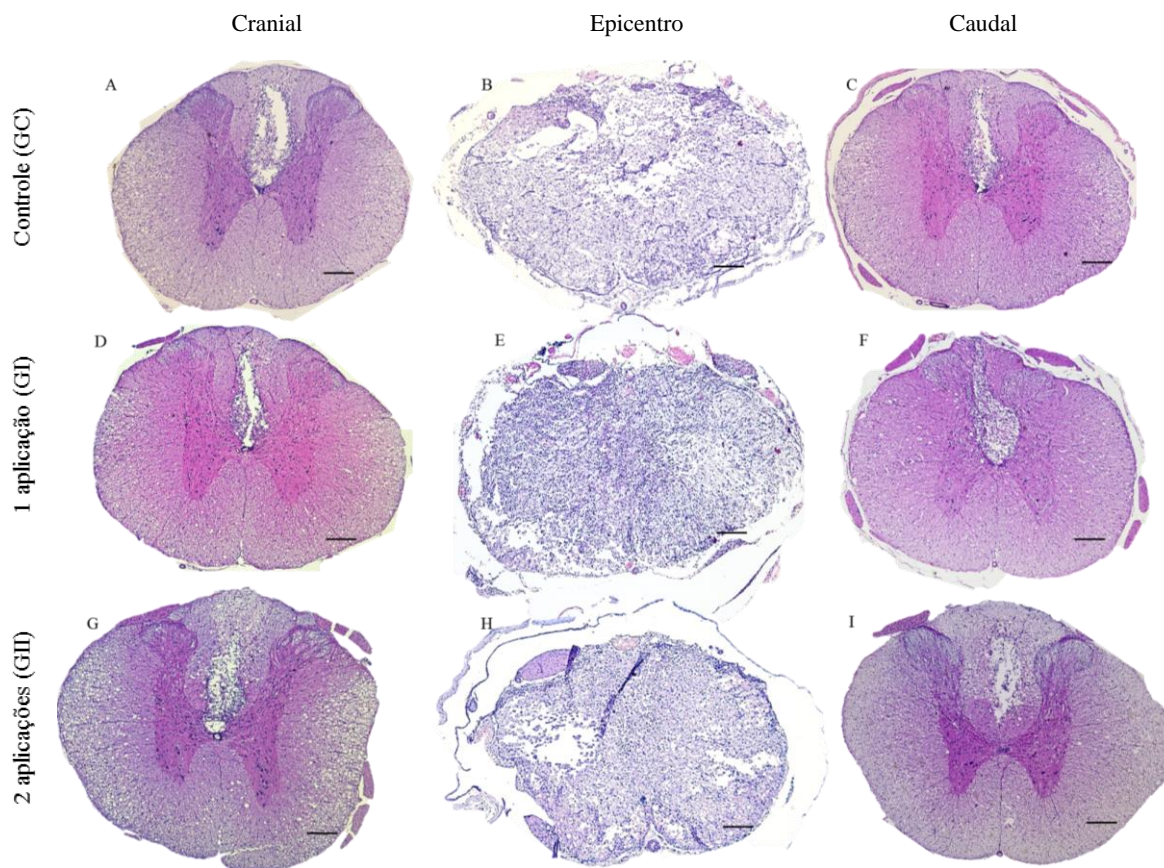


Figura 5. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos Wistar dos grupos controle (GC), tratado com uma aplicação (GI) e tratado com duas aplicações (GII), oito dias após a lesão compressiva da medula espinal: A, D e G) Cortes provenientes das regiões craniais da medula espinal de animais dos grupos GC, GI e GII, respectivamente. Nota-se malácia focalmente extensa acometendo o funículo dorsal, estendendo-se ventralmente na comissura cinzenta e lateralmente nos cornos dorsais; discreta degeneração axonal e tumefação de mielina acometendo os funículos dorsais e laterais. B, E e H) Corte proveniente da região de epicentro de medula espinal de animais dos grupos GC, GI e GII, respectivamente. Malácia acometendo toda substância branca e cinzenta. C, F e I) Cortes provenientes das regiões caudais da medula espinal de animais dos grupos GC, GI e GII, respectivamente. Observa-se área de malácia focalmente extensa no funículo dorsal e discreta degeneração axonal e tumefação de mielina acometendo os funículos dorsais e laterais. Coloração HE. Barra = 285 μ m.

No tempo de avaliação oito e 21 dias, os cortes histológicos provenientes dos segmentos cranial e caudal dos grupos GC, GI e GII apresentaram lesão com malácia focalmente extensa, acometendo o funículo dorsal (Fig 6). Nessa região observou-se uma cavitação com infiltrado de células Gitter, células que apresentavam citoplasma maior, vacuolizado, com ramificações, sugerindo maior atividade celular nos grupos GI e GII. com citoplasma amplo, vacuolizado, com ramificações (Fig. 6D e 6G). No grupo GC, predominaram células de citoplasma menores, densos e sem ramificações (Fig. 6A). Na substância cinzenta de todos os grupos foi possível encontrar alguns neurônios degenerados tanto nos cornos dorsais quanto ventrais (Fig. 6C, 6F e

6I). A substância branca demonstrava degeneração axonal discreta a moderada com tumefação axonal e da mielina difusamente distribuída ao redor da área de cavitação e nos funículos laterais, sobretudo nas regiões adjacentes aos cornos dorsais (Fig. 6). Esses achados foram mais intensos no grupo GC (Fig. 6B) do que nos grupos GI e GII (Fig. 6E e F), portanto as CTM reduziram a degeneração da substância branca.

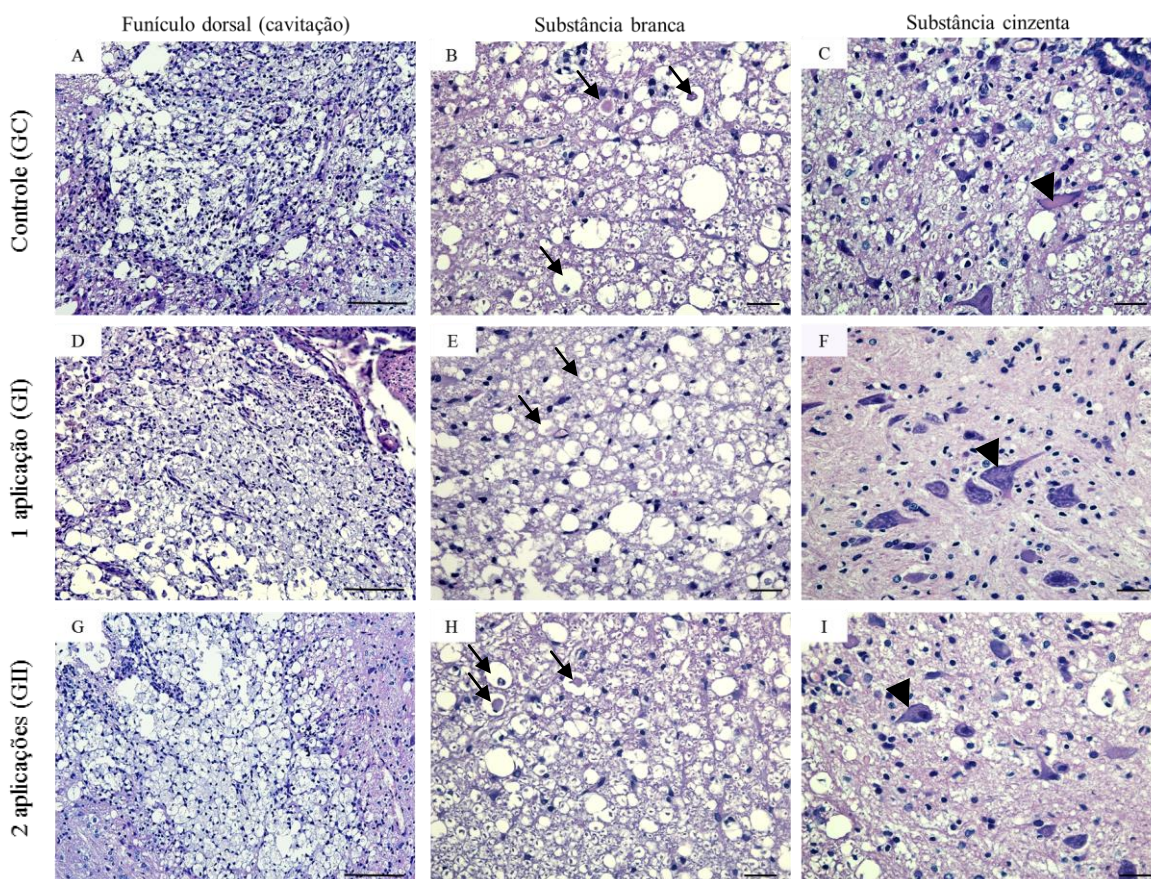


Figura 6. Fotomicroscopias de cortes histológicos dos segmentos caudais ao epicentro de medulas espinhais de ratos Wistar dos grupos controle (GC), tratado com uma aplicação (GI) e tratado com duas aplicações (GII). A, D e G) Cortes provenientes do funículo dorsal contendo área de cavitação. Notar a diferença do infiltrado celular na região da cavitação, composto predominantemente por células pequenas, citoplasma escasso, denso e poucas ramificações (A) e por células com citoplasma volumoso, vacuolizado e com ramificações (D e G). B, E e H) Corte proveniente da região do funículo lateral representando as lesões na substância branca, caracterizadas por moderada degeneração axonal e da bainha de mielina (setas). C, F e I) Cortes da substância cinzenta dos cornos ventrais evidenciando neurônios degenerados, com perda da substância de Nissl e núcleo deslocado para periferia (cabeças de setas). a Coloração HE. A, D e G: Barra = 100µm; B, C, E, F, H e I: Barra = 35 µm.

Avaliação imunohistoquímica

Através da reação imunohistoquímica com anticorpo anti-eGFP foi possível detectar a presença de poucas células positivamente marcadas nos grupos GI e GII (Fig. 7) e ausência da marcação nos grupos GS e GC, tanto com oito dias quanto com 21 dias, detectando a presença das CTM transplantadas, evidenciando a migração das células aplicadas por via intravenosa e demonstrando que as células permanecem no tecido por até 21 dias após o transplante.

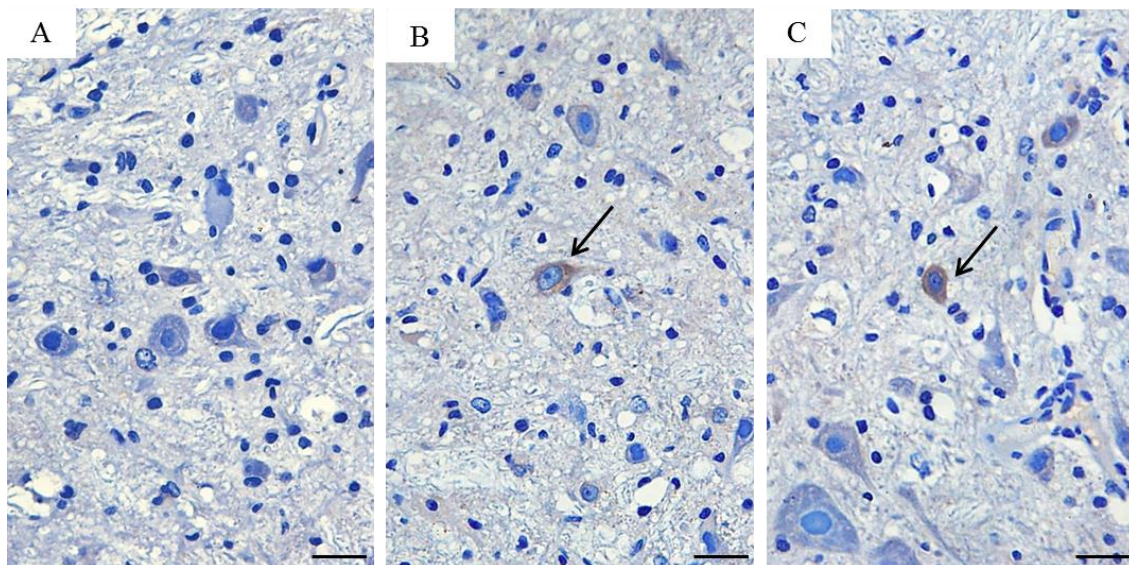


Figura 7. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos Wistar 21 dias após trauma espinal, avaliadas com anticorpo anti-eGFP. (A) Marcação negativa pelo anticorpo no grupo controle. (B e C) Marcação positiva (setas) de células pelo anticorpo anti-eGFP no grupo tratado com uma aplicação de CTMs (B) e duas aplicações (C). Estreptavidina-biotina-peroxidase contra-corado com hematoxilina de Harris. Barra = 23µm.

Houve ausência ou discreta marcação de células pelo anticorpo anti-CD68 no GS, evidenciando baixo número de células da micróglia ativadas e macrófagos, como esperado, devido a ausência de lesão neste grupo (Fig. 8A e 8B). Nas medulas de animais dos grupos GC, GI e GII houve marcação citoplasmática não uniforme pelo anti-CD68 tanto na substância branca quanto na cinzenta. A marcação foi intensa na região da cavitação no funículo dorsal (Fig. 8C, 8E e 8G), havendo diferença entre os grupos quanto às características morfológicas das células marcadas. Nos grupos GI e GII as células eram maiores e com citoplasma espumoso, enquanto no grupo GC elas apresentaram citoplasma menor e mais denso (Fig. 8D, 8F e 8H). Essa alteração sugere uma diferença no processo de ativação das células da micróglia e macrófagos nos grupos tratados com CTM.

No tempo de avaliação oito dias, a média de intensidade de expressão de pixels do anticorpo anti-CD68 na substância branca e cinzenta foi significativamente menor nos grupos GS ($0,05 \times 10^6 \pm 0,02 \times 10^6$; $0,04 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$), GI ($0,56 \times 10^6 \pm 0,39 \times 10^6$; $1,84 \times 10^6 \pm 1,58 \times 10^6$) e GII ($0,35 \times 10^6 \pm 0,23 \times 10^6$; $0,24 \times 10^6 \pm 0,21 \times 10^6$) comparado ao grupo GC ($2,92 \times 10^6 \pm 2,71 \times 10^6$; $5,54 \times 10^6 \pm 4,24 \times 10^6$) ($p < 0,05$) (Fig. 9), havendo diferença significativa entre os grupos na avaliação da substância branca, o que demonstra que o tratamento com CTM reduz a presença de células da micróglia ativadas e macrófagos na substância branca após lesão espinal. Ao analisar separadamente o funículo dorsal, região da malácia, não houve diferença quanto à expressão de CD68 entre os grupos GC ($1,29 \times 10^7 \pm 0,83 \times 10^7$), GI ($1,69 \times 10^7 \pm 1,07 \times 10^7$) e GII ($1,34 \times 10^7 \pm 0,67 \times 10^7$) ($p < 0,05$) (Fig. 9), apesar das diferenças morfológicas observadas quanto ao infiltrado de células nesta região. Portanto, a administração única ou dupla de CTM reduziu a quantidade de células da micróglia/macrófagos ativados na substância branca e cinzenta oito dias após trauma, com exceção da região de malácia no funículo dorsal. As CTM ativaram células com fenótipo antinflamatório na região da malácia do funículo dorsal.

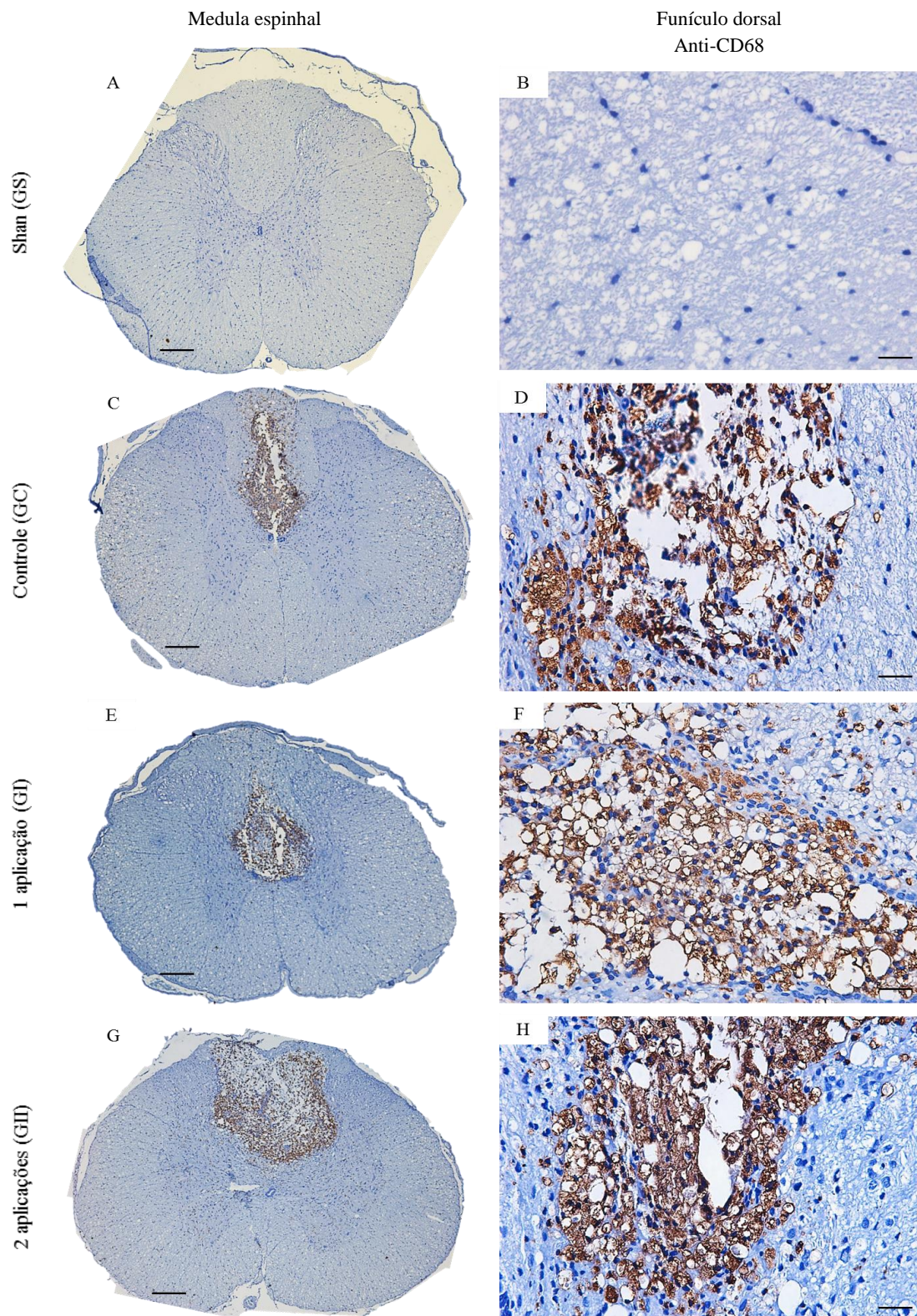


Figura 8. Fotomicroscopias de cortes histológicos da região caudal ao epicentro de medulas espinhais de ratos Wistar 8 dias após laminectomia e trauma espinal. Secções processadas pela técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-CD68, com estreptavidina-biotina-peroxidase e contra-corados com hematoxilina de Harris. Marcação pouco visível ou ausente foi observada apenas nos cortes das medulas dos animais do grupo sham (A e B). A marcação foi intensa na região da malácia localizada no funículo dorsal dos grupos controle (C e D), tratados com uma aplicação de CTM (E e F) e tratados com duas aplicações de CTM (G e G). Observou-se predomínio de células de menor volume citoplasmático e citoplasma mais denso no funículo dorsal do grupo controle (D), e células com citoplasma volumoso e menos denso nos grupos tratados com células (F e H). A. C. E e G: barra = 285µm; B. D. F e H: barra = 35µm.

Na avaliação realizada 21 dias após trauma, não houve diferença entre as médias de expressão em intensidade de pixels do anticorpo anti-CD68 na substância branca, substância cinzenta e funículo dorsal nos grupos GC ($2,96 \times 10^6 \pm 2,66 \times 10^6$; $1,64 \times 10^6 \pm 1,45 \times 10^6$; $2,20 \times 10^7 \pm 0,77 \times 10^7$), GI ($3,31 \times 10^6 \pm 1,61 \times 10^6$; $2,15 \times 10^6 \pm 1,91 \times 10^6$; $1,60 \times 10^7 \pm 0,90 \times 10^7$) e GII ($2,70 \times 10^6 \pm 2,10 \times 10^6$; $1,78 \times 10^6 \pm 1,08 \times 10^6$; $1,80 \times 10^7 \pm 0,59 \times 10^7$). Como esperado, a marcação nesses grupos foi maior do que no grupo GS ($0,07 \times 10^6 \pm 0,38 \times 10^6$; $0,04 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$; $0,06 \times 10^7 \pm 0,01 \times 10^7$) ($p < 0,05$) (Fig. 9).

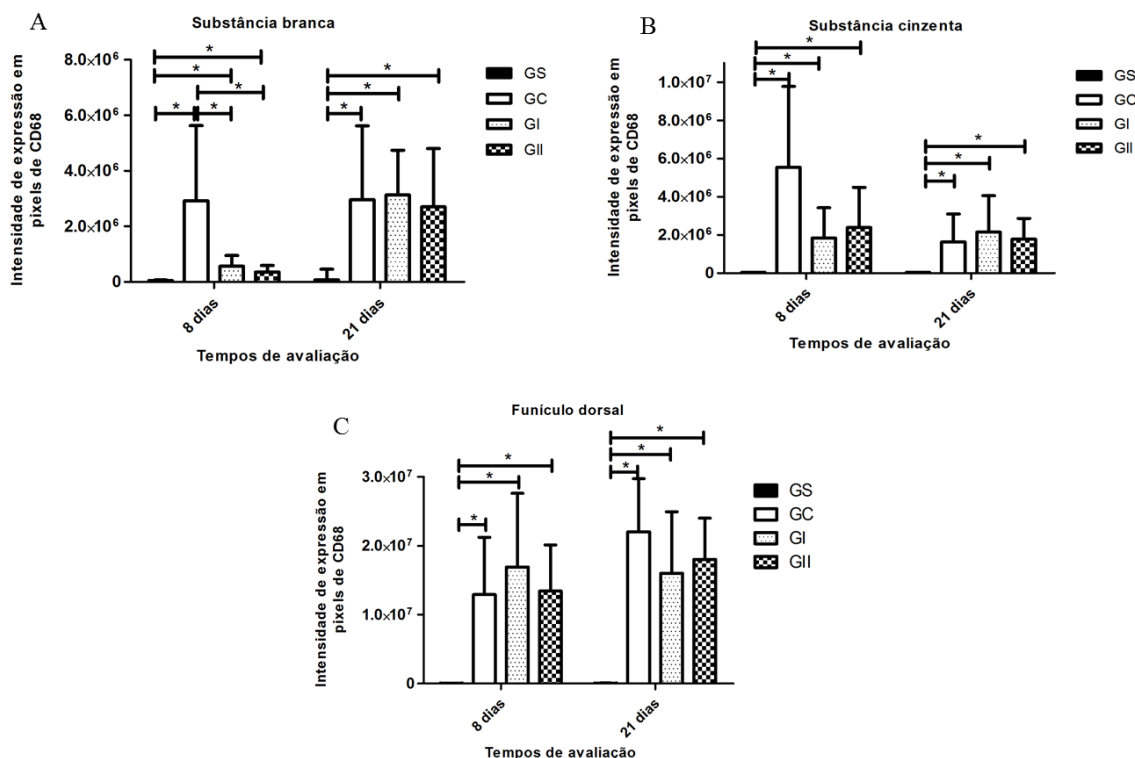


Figura 9. Intensidade de expressão em pixels de CD68 nos animais dos grupos sham (GS), controle (GC), tratados com uma dose de CTM (GI) e duas doses de CTM (GII). Representação das médias e desvio padrão da marcação com anti-CD68 na substância branca (A), substância cinzenta (B) e no funículo dorsal (C) nos tempos de 8 e 21 dias após laminectomia e indução da lesão. * $p < 0,05$.

Nas avaliações realizadas oito e 21 dias após trauma com a marcação pelo anticorpo anti-NeuN, as medulas dos animais, independentemente do grupo, apresentaram marcação citoplasmática e nuclear não uniforme, pois haviam neurônios não marcados e outros marcados com diferentes intensidades, tanto nos cornos ventrais quanto nos dorsais (Fig. 10). A média de intensidade de expressão em pixels para o anticorpo anti-NeuN com 8 dias foi significativamente maior no grupo GS ($1,67 \times 10^7 \pm 0,91 \times 10^7$), que nos grupos GC ($0,78 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$), GI ($0,48 \times 10^7 \pm 0,20 \times 10^7$) e GII ($0,54 \times 10^7 \pm 0,13 \times 10^7$) ($p < 0,05$) (Fig. 11).

A média de intensidade de expressão em pixels do anticorpo NeuN aos 21 dias foi significativamente maior nos grupos GS ($1,89 \times 10^7 \pm 0,78 \times 10^7$), GI ($1,69 \times 10^7 \pm 0,83 \times 10^7$) e GII ($1,57 \times 10^7 \pm 0,47 \times 10^7$) que no GC ($0,98 \times 10^7 \pm 0,38 \times 10^7$) ($p < 0,05$) (Fig. 11). Portanto, o tratamento com CTM, independente se em uma ou duas aplicações, aumentou a quantidade de neurônios íntegros 21 dias após trauma.

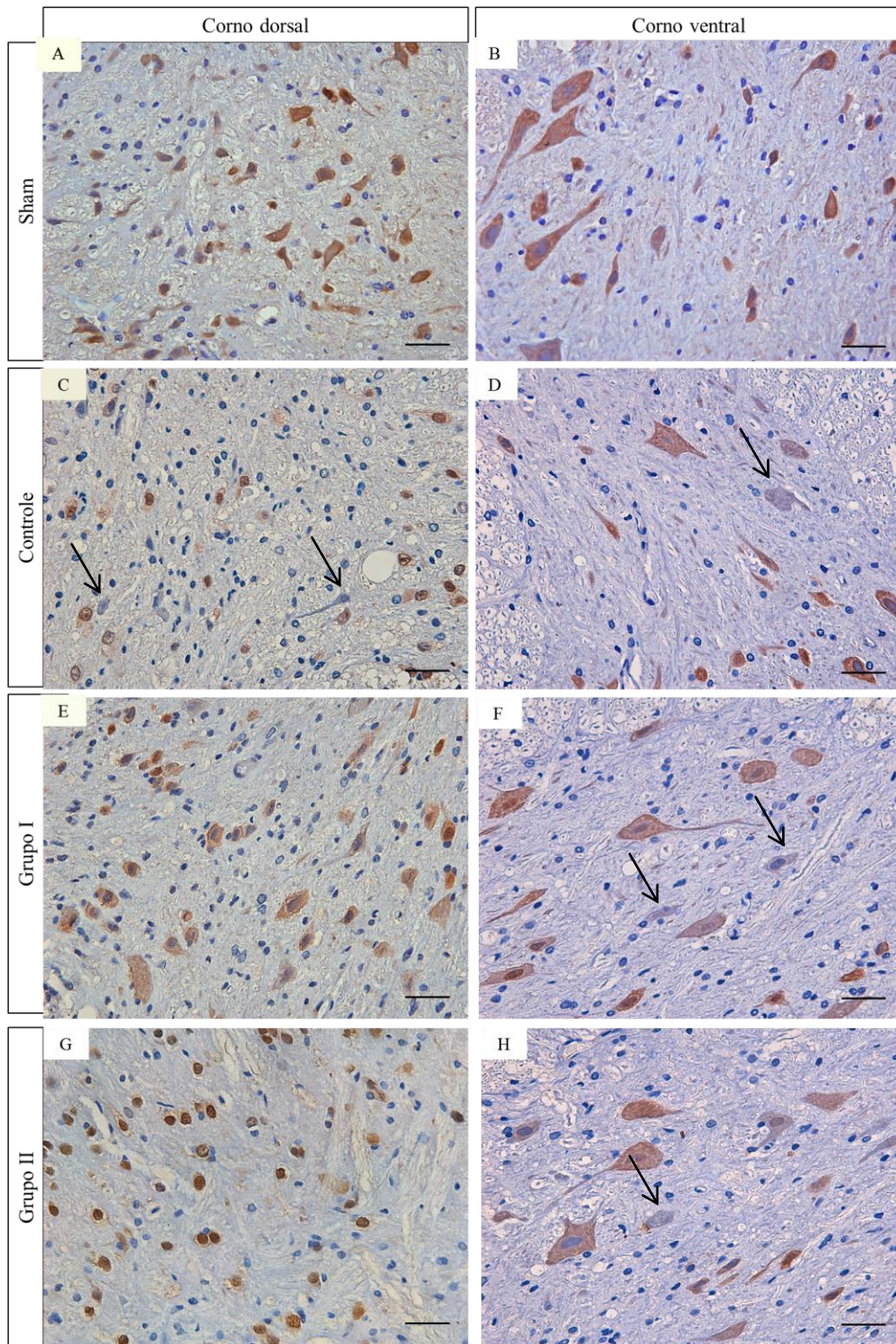


Figura 10. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos Wistar 21 dias após laminectomia e trauma espinal. Seções processadas pela técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-NeuN, com estreptavidina-biotina-peroxidase e contra-corados com hematoxilina de Harris. Marcação mais intensa nos cornos dorsal e ventral de animais do grupo sham (A e B) e nos grupos tratados com uma aplicação de CTM (E e F) e duas aplicações de CTM (G e H) do que no grupo controle (C e D). Há presença de neurônios não marcados (setas) em todos os grupos submetidos à lesão, sobretudo no corno ventral. Barra = 35µm.

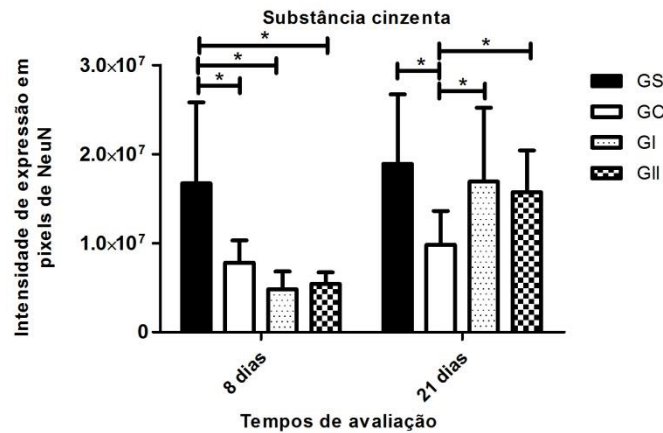


Figura 11. Intensidade de expressão em pixels de NeuN nos animais dos grupos sham (GS), controle (GC), tratados com uma dose de CTM (GI) e duas doses de CTM (GII). Representação das médias e desvio padrão da marcação com anti-NeuN na substância cinzenta nos tempos de 8 e 21 dias após laminectomia e indução da lesão espinal. * $p < 0,05$.

A marcação dos prolongamentos de astrócitos pelo anticorpo anti-GFAP nas medulas de animais em todos os grupos avaliados foi citoplasmática, não uniforme, tanto no tempo de oito quanto de 21 dias após lesão espinal. A marcação não uniforme foi caracterizada pela distribuição dos prolongamentos marcados entre substância branca e cinzenta (Fig. 12).

Na avaliação realizada oito dias pós-lesão espinal, quando comparadas às médias obtidas apenas nos funículos dorsais observou-se maior expressão no grupo GC ($1,34 \times 10^7 \pm 0,67 \times 10^7$) do que no GS ($0,52 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$), GI ($0,13 \times 10^7 \pm 0,06 \times 10^7$) e GII ($0,14 \times 10^7 \pm 0,08 \times 10^7$) ($p < 0,05$) (Fig.13), evidenciando que, independente do número de aplicações, o tratamento com CTM reduziu a ativação de astrócitos no funículo dorsal oito dias após trauma. Por outro lado, quando comparada as expressões em toda substância branca não houve diferença entre os grupos GS ($1,80 \times 10^7 \pm 0,64 \times 10^7$), GC ($1,76 \times 10^7 \pm 0,40 \times 10^7$), GI ($1,79 \times 10^7 \pm 0,33 \times 10^7$) e GII ($1,68 \times 10^7 \pm 0,36 \times 10^7$) no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$) (Fig. 13). Quanto a substância cinzenta, o grupo GS ($1,01 \times 10^7 \pm 0,75 \times 10^7$) apresentou diferença significativa com os grupos GC ($2,00 \times 10^7 \pm 0,57 \times 10^7$), GI ($1,90 \times 10^7 \pm 0,34 \times 10^7$) e GII ($1,78 \times 10^7 \pm 0,68 \times 10^7$) no tempo de avaliação oito dias ($p < 0,05$) (Fig. 13).

Aos 21 dias após lesão espinal, a média de intensidade de expressão em pixels de GFAP na substância cinzenta foi maior no grupo GC ($1,73 \times 10^7 \pm 0,49 \times 10^7$) que nos grupos GI ($1,06 \times 10^7 \pm 0,52 \times 10^7$), GII ($0,89 \times 10^7 \pm 0,43 \times 10^7$) e GS ($1,10 \times 10^7 \pm 0,80 \times 10^7$) ($p < 0,05$) (Fig. 13). Dessa forma, as CTM reduziram a ativação de astrócitos na substância cinzenta tanto com uma quanto duas aplicações intravenosas. Quando realizada a comparação entre as médias obtidas somente no funículo dorsal, a marcação foi maior nos grupos com lesão espinal, independente do tratamento (GC: $1,37 \times 10^7 \pm 0,91 \times 10^7$; GI: $1,13 \times 10^7 \pm 0,80 \times 10^7$; GII: $1,04 \times 10^7 \pm 0,76 \times 10^7$), do que no GS ($0,52 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$). Na substância branca não houve diferença entre os grupos GS ($1,80 \times 10^7 \pm 0,64 \times 10^7$), GC ($1,59 \times 10^7 \pm 0,34 \times 10^7$), GI ($1,61 \times 10^7 \pm 0,29 \times 10^7$) e GII ($1,34 \times 10^7 \pm 0,45 \times 10^7$) quanto à marcação pelo anticorpo anti-GFAP ($p < 0,05$) (Fig. 13).

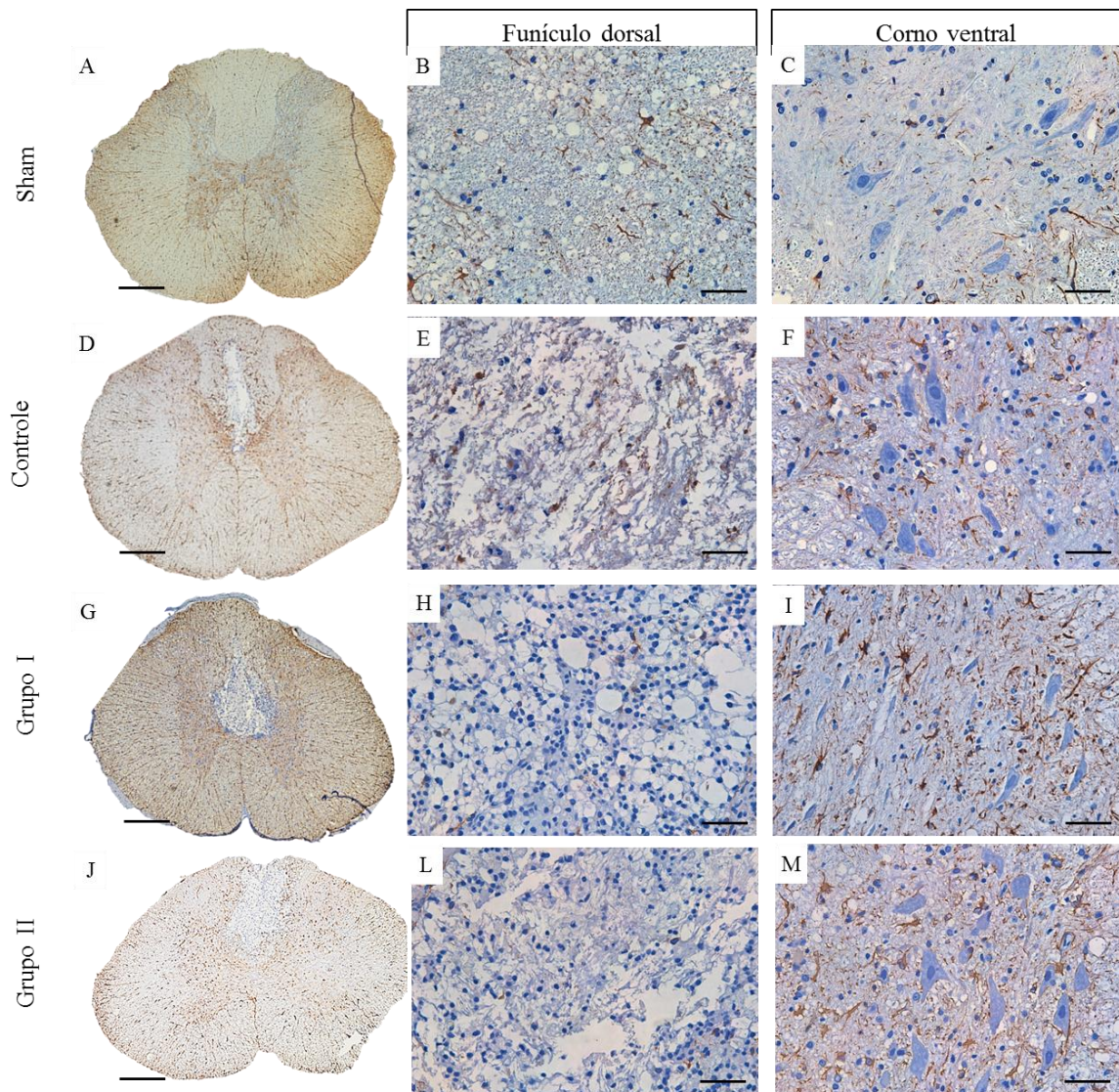


Figura 12. Fotomicroscopias de cortes histológicos de medulas espinhais de ratos Wistar 21 dias após laminectomia e trauma espinal. Secções processadas pela técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP, com estreptavidina-biotina-peroxidase e contra-corados com hematoxilina de Harris. Marcação distribuída na substância branca e cinzenta de forma não uniforme nos grupos GS (A,B e C), GC (D, E e F), GI (G, H e I) e GII (J, L, M). No funículo dorsal, nota-se marcação de prolongamentos no grupo controle (E) e pouca ou nenhuma marcação nos grupos tratados com CTM (H e L). A, D, G e J: barra = 285 μ m; B, C, E, F, H, I, J e M: barra = 35 μ m.

Avaliação da expressão relativa das citocinas e fatores neurotróficos

Na análise das citocinas pró e antiinflamatórias por RT-qPCR foi observada maior expressão relativa de IL-10 nos grupos tratados com CTM (GI: 7,57 \pm 1,88; GII: 6,87 \pm 1,68) 24 horas pós-trauma, em relação ao grupo controle (2,54 \pm 0,79). A expressão relativa de IL-10 foi ainda significativamente maior no grupo GII (4,28 \pm 0,17; 1,42 \pm 0,31) que nos grupos GI (0,18 \pm 0,17; 0,04 \pm 0,03) e GC (0,26 \pm 0,28; 0,08 \pm 0,05) no oitavo e 21^o dias após a lesão. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos de 48 horas (GC: 1,48 \pm 1,09; GI: 1,56 \pm 0,67; GII: 1,62 \pm 0,61) e 72 horas (GC: 2,42 \pm 1,45; GI: 1,13 \pm 0,43; GII: 1,21 \pm

0,39). Não houve diferença entre os grupos GC e GI nos tempos de oito e 21 dias após a lesão ($p < 0,05$) (Fig. 14).

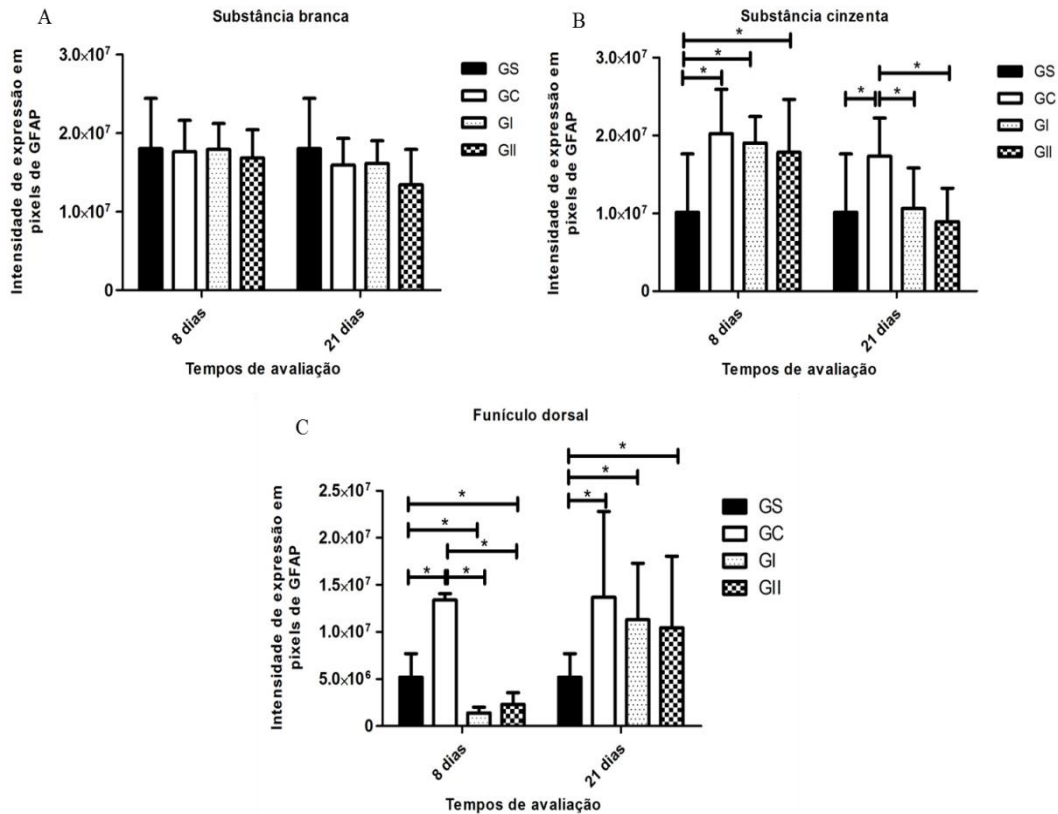


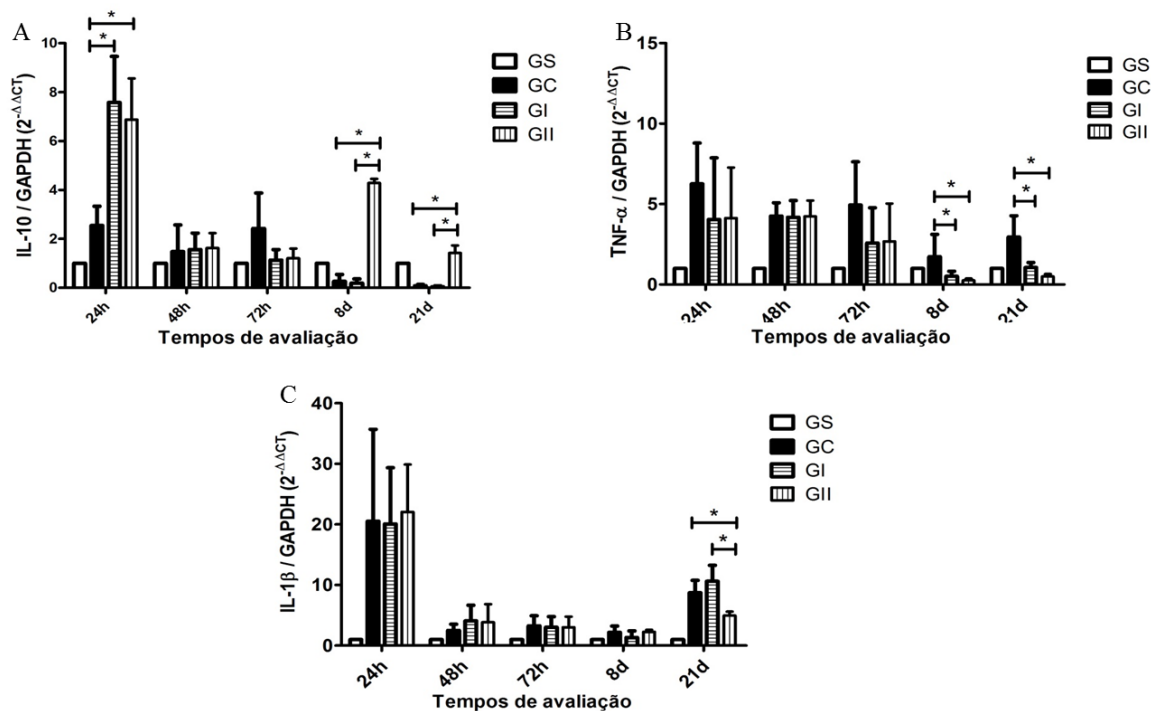
Figura 13. Intensidade de expressão em pixels de GFAP nos animais dos grupos sham (GS), controle (GC), tratados com uma dose de CTM (GI) e duas doses de CTM (GII). Representação das médias e desvio padrão da marcação com anti-GFAP na substância branca (A), substância cinzenta (B) e no funículo dorsal (C) nos tempos de 8 e 21 dias após laminectomia e indução da lesão. * $p < 0,05$.

A expressão relativa de $TNF-\alpha$ não diferiu entre os grupos nos tempos de 24 horas (GC: $6,25 \pm 4,54$; GI: $4,03 \pm 3,83$; GII: $4,12 \pm 3,14$), 48 horas (GC: $4,25 \pm 0,82$; GI: $4,17 \pm 1,04$; GII: $4,23 \pm 0,98$) e 72 horas (GC: $4,94 \pm 2,68$; GI: $2,56 \pm 2,20$; GII: $2,68 \pm 2,53$). No oitavo (GC: $1,72 \pm 1,38$; GI: $0,51 \pm 0,31$; GII: $0,25 \pm 0,11$) e 21º dia (GC: $2,94 \pm 1,32$; GI: $1,05 \pm 0,31$; GII: $0,50 \pm 0,15$) pós-lesão, os grupos tratados com CTM apresentaram significativa redução na expressão de $TNF-\alpha$ ($p < 0,05$) (Fig. 14). Embora GII tenha apresentado menor expressão de $TNF-\alpha$ do que GI, não houve diferença estatisticamente significativa.

Não houve diferença da expressão de $IL-1\beta$ entre os grupos GC, GI e GII nos tempos de avaliação 24h ($20,51 \pm 15,19$; $20,07 \pm 9,28$; $22,01 \pm 7,82$), 48h ($2,48 \pm 1,04$; $4,07 \pm 2,58$; $3,84 \pm 2,97$), 72h ($3,25 \pm 1,67$; $3,01 \pm 1,76$; $3,12 \pm 1,89$) e oito dias ($2,18 \pm 1,03$; $1,32 \pm 1,09$; $2,26 \pm 0,32$). Com 21 dias observou-se diferença estatística entre o GII e os GC e GI (GC: $8,70 \pm 2,06$; GI: $10,60 \pm 2,63$; GII: $4,94 \pm 0,65$) ($p < 0,05$) (Fig. 14).

Quanto aos fatores neurotróficos houve redução significativa na expressão relativa de $TGF-\beta$ nos grupos tratados com CTM nos tempos de avaliação 24h (GC: $10,31 \pm 4,57$; GI: $2,53 \pm 0,40$; GII: $2,39 \pm 0,76$) e 21 dias (GC: $7,14 \pm 1,58$; GI: $4,03 \pm 2,34$; GII: $3,48 \pm 1,94$) após trauma, quando comparados ao GC. As diferenças entre os grupos GC, GI e GII não foram observadas nos

tempos de avaliação 48h ($2,89\pm1,68$; $3,90\pm2,99$; $2,97\pm1,45$), 72h ($3,92\pm2,26$; $2,90\pm0,74$; $2,90\pm1,44$) e oito dias ($11,84\pm7,58$; $15,35\pm12,88$; $13,89\pm6,78$) pós trauma ($P<0,05$). Não houve diferença entre os grupos tratados com CTM em nenhum momento da avaliação (Fig. 15).



Não houve diferença entre a expressão relativa de BDNF obtida nos grupos GC, GI e GII com 24h ($0,87\pm0,32$; $1,09\pm0,43$; $0,92\pm0,75$), 48h ($0,60\pm0,25$; $0,71\pm0,20$; $0,80\pm0,23$), 72h ($0,16$; $0,06$; $0,25\pm0,20$; $0,17\pm0,09$) e 21 dias ($0,24\pm0,15$; $0,41\pm0,33$; $0,85\pm0,38$) após trauma. No oitavo dia pós-lesão, houve incremento significativo na secreção de BDNF pelo grupo GII quando comparado ao GC e ao GI (GC: $0,10\pm0,03$; GI: $0,11\pm0,04$; GII: $1,18\pm0,45$) ($P<0,05$) (Fig. 15).

Nos tempos de 48h (GC: $8,22\pm4,19$; GI: $24,45\pm15,38$; GII: $19,67\pm7,89$) e oito dias (GC: $0,38\pm0,12$; GI: $1,43\pm0,62$; GII: $4,40\pm0,10$) pós-lesão, a expressão relativa de GDNF foi significativamente maior nos grupos tratados com CTM que no GC. Com 21 dias pós-lesão, o grupo GII ($1,64\pm0,26$) apresentou maior expressão que o GC ($0,05\pm0,02$) e o GI ($0,02\pm0,01$). Não existiu diferença entre os grupos GC, GI e GII com 24h ($5,87\pm3,18$; $9,78\pm2,55$; $6,78\pm3,24$) e 72h ($2,48\pm1,71$; $2,21\pm1,48$; $1,89\pm2,23$) após trauma ($P<0,05$) (Fig. 15).

A expressão relativa de VEGF foi significativamente maior no grupo GII comparado aos grupos GI e GC no tempo de oito dias pós-lesão (GC: $0,19\pm0,06$; GI: $0,22\pm0,15$; GII: $1,25\pm0,56$). Houve maior expressão de VEGF nos grupos tratados com CTM comparado ao GC no tempo de avaliação 21 dias pós lesão (GC: $0,95\pm0,33$; GI: $1,78\pm0,15$; GII: $4,20\pm0,89$). Não houve diferença entre os grupos GC, GI e GII nos momentos de avaliação 24h ($0,98\pm0,37$; $1,20\pm0,16$;

0,87±0,63), 48h (0,11±0,07; 0,13±0,03; 0,11±0,05) e 72h (0,07±0,03; 0,11±0,06; 0,10±0,10) (P<0,05) (Fig. 15).

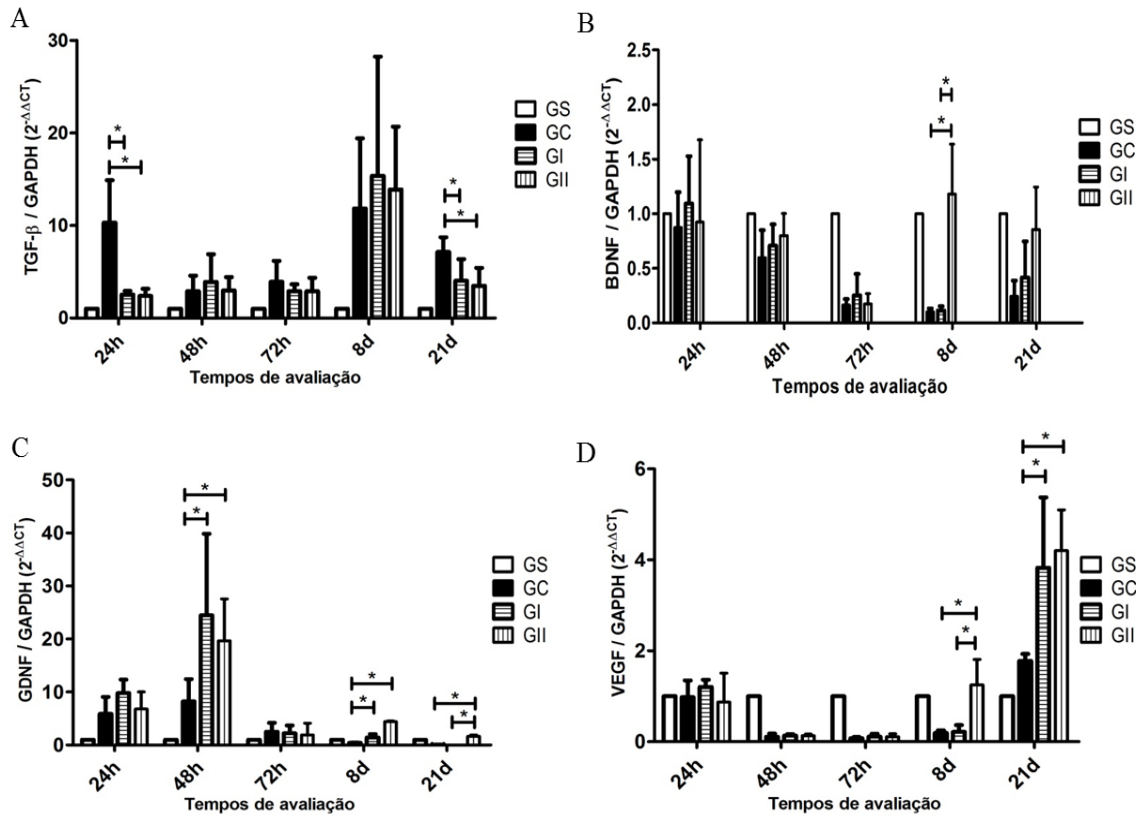


Figura 15. Efeito do tratamento com CTM sobre a expressão gênica relativa dos fatores neurotróficos após trauma espinal em ratos. Representação gráfica da quantificação relativa (média e desvio padrão) do transcrito gênico para TGF-β (A), BDNF (B), GDNF (C) e VEGF (D) pela técnica de RT-qPCR nos animais do grupo shan (GS), controle (GC), tratados com uma aplicação de CTM (GI) e tratados com duas aplicações de CTM (GII), avaliados às 24, 48, 72 horas e oito e 21 dias após trauma espinal. *p<0,05.

DISCUSSÃO

O modelo do trauma espinal com a metodologia de Martin et al. (1992) demonstrou ser uma técnica de simples execução, reprodutível e capaz de induzir lesão moderada a grave da medula espinal em ratos, evidenciada pelos escores mínimos (0 à 2) obtidos 24 horas após o trauma compressivo com cateter de Fogarty n.2 Fr em todos os grupos experimentais submetidos à lesão. A ausência de movimentação é a principal apresentação clínica de pacientes nos serviços de traumatologia e neurocirurgia (Sekhon e Fehlings, 2001). Somam-se à paraplegia as alterações viscerais, sobretudo hematúria e retenção urinária, e a perda da nocicepção (Olby, 2010; Spitzbarth et al., 2011). Embora não tenha sido avaliado a perda da nocicepção, houve comprometimento da micção voluntária em todos os animais submetidos ao trauma espinal.

Disfunções vesicais são comuns em lesões espinais toracolombares devido ao acometimento das vias espinoreticulares (aférente) e reticuloespinal (eferente). Como resultado dessas lesões nas vias neuronais, o músculo detrusor da bexiga permanece relaxado promovendo o acúmulo de urina ao mesmo tempo que o músculo esfíncter uretral interno permanece contraído, impedindo

o esvaziamento vesical espontâneo, resultando dessa forma na retenção urinária (Meyer et al., 2003; Mitsui et al., 2005), conforme observado em todos os animais submetidos ao trauma espinal. A retenção urinária, bem como a hematuria são alterações comumente observadas em pacientes após lesão espinal (Mitsui et al., 2005; Caldeira, 2011), que podem complicar o quadro clínico do paciente por predispor à cistite e infecções ascendentes e obstruções uretrais (Mitsui et al., 2005). A realização da massagem vesical em todos os animais submetidos ao procedimento cirúrgico associado à utilização de antimicrobiano profilaxia permitiu que os animais não desenvolvessem sinais clínicos sugestivos de cistite ou demais infecções dos órgãos urinários, embora Meyer et al. (2003) demonstrou que há aumento da microbiota em 48 horas após a lesão medular mesmo não ocorrendo sinais clínicos de infecção. Não houve diferença em relação ao tempo de recuperação do controle vesical entre os grupos submetidos à lesão espinal. O fato de todos os animais restabelecerem o controle da micção e recuperação gradual da função motora demonstra que o modelo de trauma utilizado no experimento foi adequado. Modelos que geram lesões extremamente graves limitam a avaliação funcional e não promovem condições adequadas para avaliar o efeito farmacológico, indesejados para estudos terapêuticos (Onifer et al., 2007).

A hematuria observada por três dias na maioria dos animais submetidos ao trauma era esperada devido à irritação e ulceração da mucosa vesical, com consequente ruptura do uroepitélio e cistite hemorrágica com pico em seis horas pós-trauma espinal (Herrera et al., 2010). A hematuria pode complicar adicionalmente a retenção urinária por predispor à formação de coágulos que obstruem a uretra (Meyer et al., 2003).

Os protocolos anestésico e de analgesia foram eficientes, pois não houveram alterações comportamentais nos animais durante o pós-cirúrgico que caracterizasse dor. O procedimento cirúrgico foi bem planejado e executado segundo critérios rigorosos de antisepsia, o que resultou em uma boa cicatrização da ferida cirúrgica. A formação de seroma observada em alguns animais nas primeiras 48 horas de pós-operatório foi correlacionada com inadequada redução de espaço morto ao término do procedimento cirúrgico, causa comum do acúmulo de secreções e sangue no tecido subcutâneo (Hurwitz et al., 2014). O tratamento rápido e adequado dos animais com seroma e todos os cuidados adotados do pré ao pós-operatório são importantes para que os resultados obtidos nas avaliações terapêuticas sejam confiáveis (Ramsey et al., 2010). O acesso cirúrgico para laminectomia não causou lesão espinal nos animais, evidência comprovada pelo escore 21 dos animais do GS.

A avaliação neurológica realizada através da escala de escores propostas por Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (Basso et al., 1995), é um método simples, rápido e internacionalmente aceito nas avaliações da função motora em modelos experimentais de ratos com lesão espinal (Ma et al., 2001; Sedy et al., 2008). Embora outros métodos de análise estejam sendo utilizados, a avaliação pela escala de BBB apresenta maior número em publicações com análises da função motora após trauma (Onifer, et al., 2007; Zhang e He, 2014). A maior vantagem do teste é a metodologia baseada em movimentos naturais dos animais, o que evita submetê-los a testes estressantes como os de equilíbrio em barra ou plataformas especiais (Basso et al., 1995; Basso et al., 1996a; Muir e Webb, 2000).

Basso et al. (1995) afirma que o teste não requer treinamento prévio, contudo todos os animais do presente estudo foram submetidos ao teste diariamente na semana que antecedeu ao início do período experimental, devido à constatação do condicionamento prévio aumentar a movimentação dos animais no campo de avaliação, o que facilita a avaliação da função motora dos animais (Sedy et al., 2008). No presente estudo, foram utilizados dois avaliadores

previamente treinados que desconheciam a que grupo os animais avaliados pertenciam e a qual tempo de avaliação os mesmos se encontravam. Segundo Agrawal et al. (2009), apesar do teste BBB se constituir de uma escala com 21 pontos, o treinamento rigoroso dos avaliadores, que objetiva a padronização e coerência dos mesmos reduz a subjetividade do teste. Zhang e He (2014), demonstraram em estudo de meta-análise da função locomotora pelo teste de BBB em ratos tratados com CTM de diferentes artigos, que os grupos tratados adquirem maiores notas na escala ao redor do terceiro dia após o transplante. Ainda é difícil realizar comparações com o teste BBB entre estudos com transplante de CTM, pois os trabalhos utilizam diferentes tempos de aplicação das células após a lesão (Zhang e He, 2014).

Através da avaliação funcional com o teste de BBB, foi demonstrado que o tratamento com CTM tanto em única aplicação quanto em dois momentos de transplante intravenoso, promove significativa melhora da função motora após lesão espinal. Os animais tratados com as CTM não só apresentaram maior pontuação da escala como também tiveram passo plantar com suporte do peso durante a locomoção. Salienta-se que no mesmo período de avaliação os animais do grupo controle não apresentavam suporte de peso e exibiam movimentos amplos das articulações do membro pélvico ou pedaladas, sem apoio plantar para locomoção. Destaca-se que além de exibirem maiores valores na escala, os animais tratados com duas aplicações apresentaram passadas coordenadas. Se faz necessário ressaltar que a ausência de comprometimento da função motora nos animais do grupo sham, mesmo 24 horas após a cirurgia, demonstra que a execução da laminectomia não resultou em lesão do tecido nervoso, excluindo um fator adicional à lesão espinal e consequente comprometimento dos resultados obtidos.

As evidências de recuperação precoce da função locomotora, presentes três dias após lesão e transplante, foram relatadas previamente com o uso de CTM em lesão espinal aguda em ratos (Quertainmont et al., 2012), sugerindo ação precoce após aplicação intravenosa das CTM. Em contrapartida, alguns estudos registram melhora da função motora a partir de sete dias (Urdzíkóvá et al., 2006; Nakajima et al., 2012) ou mais (Sasaki et al., 2009; Hu et al., 2010b; Tetzlaff et al., 2011; Kang et al., 2012; Kim et al., 2013; Jia et al., 2014; Song et al., 2014) após o transplante das CTM.

A avaliação por ressonância magnética (RM) permitiu identificar a lesão na medula espinal, contudo a formação de artefatos devido à movimentação respiratória, impediu a utilização desta técnica para mensurar a área de lesão entre os grupos. A disponibilidade apenas de obtenção das imagens em cortes transversais e ponderação T1 aumentou a dificuldade de estabelecer adequada visualização da área de lesão. Devido à hemorragia ou necrose tecidual, a ponderação T2 é recomendada por permitir maior definição da lesão após trauma espinal (Anderson et al., 2005; Liu et al., 2011). Apesar das limitações encontradas com a técnica de RM neste estudo, este é um método de alta resolução, não invasivo que permite avaliação das características da lesão, evolução da mesma ao longo do tempo e reparo tecidual, além de permitir identificar migração de células especialmente preparadas (Hill et al., 2003; Anderson et al., 2005).

A administração das CTM por via intravenosa comprovou ser uma técnica segura e facilmente executada em ratos, não necessitando de sedação ou anestesia. Ainda dispensa a necessidade de reintervenção cirúrgica utilizada na administração *in situ*, é minimamente invasiva e não apresenta as potenciais complicações das administrações via intra-tecal e *in situ* (Paul et al., 2009; Takahashi et al., 2011; Osaka et al., 2010; Kang et al., 2012; Quertainmont et al., 2012). Adicionalmente, esta é a via de maior potencial para aplicação clínica e demonstra resultados satisfatórios em estudos com trauma espinal (Takeuchi et al., 2007; Osaka et al., 2010;

Takahashi et al., 2011; Carvalho, 2011; Kang et al., 2012; Quertainmont et al., 2012), cerebral (Chen et al., 2001; Mahmood et al., 2005; Walker et al., 2010) e isquemia cerebral (Honma et al., 2006).

A presença de células marcadas pelo anticorpo anti-eGFP na medula dos animais tratados com as CTM criopreservadas demonstra a capacidade de migração das CTM para a lesão espinal após administração intravenosa. A migração das CTM aplicadas por esta via intravenosa foi demonstrada previamente em estudos com infarto do miocárdio (Shake et al., 2002; Hill et al., 2003; Assis et al., 2010; Carvalho et al., 2013), isquemia cerebral (Wang et al., 2002) e lesão espinal (Jendelová et al., 2004; Urdzíkóvá et al., 2006; Takeuchi et al., 2007; Paul et al., 2009; Osaka et al., 2010; Carvalho, 2011). É válido ressaltar que quando administradas por via intravenosa, deve-se considerar a retenção de células na microcirculação, sobretudo pulmonar, e que nem todas as células chegam ao local de ação (Paul et al., 2009; Carvalho et al., 2013). Administrações intra-tecais e intra-arteriais estão em investigação devido ao potencial em fornecer maior número de CTM para lesões do sistema nervoso central (Paul et al., 2009; Osaka et al., 2010; Takahashi et al., 2011), contudo a via intravenosa é menos invasiva e de maior potencial para aplicação clínica (Paul et al., 2009; Quertainmont et al., 2012; Kang et al., 2012).

Diferentes métodos de avaliação, como marcação das células por BrdU (Quertainmont et al., 2012), marcador nuclear Hoechst-33258 (Violatto et al., 2015), uso de células transgênicas fluorescentes (Shang et al., 2011; Jia et al., 2014), marcação com nanopartículas fluorescentes (Carvalho, 2011; Violatto et al., 2015), marcador fluorescente de membrana PKH26 (Urdzíkóvá et al., 2006; Sasaki et al., 2009; Kang et al., 2012; Nakajima et al., 2012; Kim et al., 2013) e marcação com óxido de ferro superparamagnético para avaliação por ressonância magnética (Hu et al., 2010b; Karussis et al., 2010; Liu et al., 2011) demonstram que as CTM atingem a lesão espinal. Apesar da presença de células marcadas com anti-eGFP, as mesmas foram encontradas em baixo número em ambos os grupos tratados, e somente foram encontradas após extensa pesquisa em cortes seriados. Quertainmont e colaboradores (2012) não encontraram células marcadas no tecido espinal após lesão e nem em órgãos parenquimatosos como pulmão, fígado, baço e rim, com sete, 14 e 21 dias após aplicação das células, contudo observaram evidente melhora funcional dos membros pélvicos. Sugere-se que os benefícios encontrados em diferentes trabalhos decorram da secreção de citocinas ou fatores de crescimento e não da incorporação e diferenciação das CTM no tecido nervoso (Parr et al., 2007). De fato, o número de células encontradas após transplante não é suficiente para explicar a rápida melhora da função locomotora (Parr et al., 2007; Quertainmont et al., 2012).

O pequeno número de células positivamente marcadas com o anticorpo anti-eGFP na medula espinal dos grupos tratados com CTM associado à características anatomohistopatológicas, imunohistoquímicas e recuperação funcional encontradas no presente estudo, os benefícios da terapia com CTM ocorrem por ação parácrina e não por diferenciação celular. A utilização das CTM não só reduziu o infiltrado inflamatório como ativou células da micróglia/macrófagos com fenótipo anti-inflamatório e aumentou a quantidade de neurônios íntegros, independente se realizado um ou dois transplantes de células. Além disso, as CTM diminuíram a degeneração da substância branca e a ativação de astrócitos. O tratamento com CTM criopreservadas estimulou a expressão de IL-10, reduziu o TNF α e TGF- β e aumentou a expressão dos fatores neurotróficos GDNF e VEGF. O tratamento com duas aplicações de CTM foi capaz de somar os benefícios anteriores com aumento da expressão de BDNF e aumentar a expressão tardia de IL-1 β .

Estudos *in vitro* mostraram que as CTM são capazes de produzir IL-10 (Nakano et al., 2010; Zhukareva et al., 2010), sugerindo que elas sejam as responsáveis pelo aumento da expressão de IL-10 nas medulas dos animais tratados. Outro achado que corrobora este fato é que o incremento significativo da expressão de IL-10 ocorreu após 24 horas após a primeira administração intravenosa das CTM e se repetiu 24 horas após a segunda administração de células. Os benefícios da IL-10 no trauma espinal em modelos experimentais foram previamente comprovados (Bethea et al., 1999; Zhou et al., 2009). A IL-10 é uma importante citocina antiinflamatória que reduz a resposta mediada por macrófagos e microglia (O'Farrell et al., 1998; Bethea et al., 1999; Plunkett et al., 2001), correlaciona-se com a redução de TNF- α produzido pelos astrócitos bem como a apresentação de antígenos pela microglia e astrócitos (Bethea et al., 1999). A IL-10 é responsável por reduzir a infiltração leucocitária através da barreira hematoencefálica (Knoblauch e Fadem, 1998), diminuindo o infiltrado inflamatório no tecido nervoso; reduzir a ativação de astrócitos, a apoptose neuronal e de oligodendrócitos; e promover recuperação funcional após lesão espinal (Bethea et al., 1999; Brewer et al., 1999; Zhou et al., 2009). Evidências sugerem que a IL-10 inibe a expressão de moléculas de adesão e ativa células da micróglia com fenótipo antiinflamatório (Wirjatijasa et al., 2002; Chen et al., 2015), efeitos descritos no tecido nervoso somente quando ocorre aumento de sua concentração nas primeiras 24 horas após lesão espinal (Zhou et al., 2009).

Houve correlação entre o aumento da expressão de IL-10 e a redução da expressão de TNF- α nos animais tratados com CTM no presente estudo. Os níveis de expressão gênica relativa de TNF- α foram menores nos mesmos tempos em que houve aumento da expressão de IL-10, sobretudo após a segunda administração das células. A redução de TNF- α com aumento de IL-10 observada apenas nos grupos transplantados, demonstra a ação antiinflamatória das CTM após lesão espinal (Urdzíkóvá et al., 2014). O TNF- α amplifica a resposta inflamatória, induz apoptose neuronal e de oligodendrócitos e promove desmielinização, agravando a lesão do tecido nervoso após o trauma espinal (Lau e Yu, 2001; Wang e Shuaib, 2002; Nakamura et al., 2003; Yune et al., 2013), portanto é considerada uma citocina pró-inflamatória citotóxica que ativa as células da micróglia/macrófagos (e é por sua vez produzido por estas células) e astrócitos (Shuman et al., 1997; Bethea et al., 1999; Donnelly e Popovich, 2008; Chen et al., 2015). A ativação do TNF- α está correlacionada a morte celular mediada pelo glutamato e ao aumento da produção de óxido nítrico através da indução da óxido nítrico sintetase (iNOS) (Hausmann, 2003; Donnelly e Popovich, 2008).

No grupo controle houve maior expressão de TNF- α nos tempos 24h, 72h, oito e 21 dias, sendo significativa as diferenças com oito e 21 dias após trauma, indicando reação inflamatória mais intensa nesse grupo do que nos tratados com CTM. Dois picos na produção desta citocina são conhecidos após lesão espinal, um com oito horas (seguido por redução gradativa) e outro com sete dias. Após o segundo pico de TNF- α , as concentrações permanecem altas até quatorze dias após lesão. O segundo pico de TNF- α ocorre devido produção por células da micróglia e macrófagos ativadas presentes no local de lesão (Zhukareva et al., 2010; Nishimura et al., 2013; Wang et al., 1996; Wang et al., 1997; Lau e Yu, 2001; Nakamura et al., 2003; Yune et al., 2003; Zhukareva et al., 2010; Rem e Young, 2013; Chen et al., 2015). Nos resultados obtidos no presente estudo, houve alta expressão de TNF- α a partir do oitavo dia e permanecendo elevado até o vigéssimo primeiro dia. Esses achados foram acompanhados por maior quantidade de células da micróglia/macrófagos ativados marcados pelo anticorpo anti-CD68. Atribuí-se à micróglia/macrófago a responsabilidade pela maior produção de TNF- α no tempo de avaliação oito dias. Por outro lado, o aumento na expressão de TNF- α 21 dias após trauma pode ter ocorrido por astrócitos, uma vez que não houve diferença entre as marcações de CD68 mas

observou-se astrogliose e maior expressão de GFAP no grupo controle nesse tempo de avaliação. Ressalta-se que essa citocina também pode ter causado a degeneração de substância branca mais intensa que foi observada nesse mesmo grupo e tempo de avaliação, pois o TNF- α provoca desmielinização (Wang e Shuaib, 2002; Yune et al, 2013).

Embora as CTM possam produzir TNF- α (Deans e Moseley, 2000), não se observou incremento desta citocina nos grupos tratados e sim redução na expressão da mesma, como em outros estudos com CTM em lesão espinal (Hawryluk et al., 2012; Nakajima et al., 2012; Rem e Young, 2013). Os mecanismos pelos quais os tratamentos com CTM reduziram a produção de TNF- α foram atribuídos ao aumento simultâneo de IL-10 e redução do infiltrado inflamatório concomitante, permitindo melhora funcional da locomoção (Sharma et al., 2003; Rem e Young, 2013; Urdzíkóvá et al., 2014). Portanto, a administração de CTM em ambos os grupos, reduziu a expressão de TNF oito e 21 dias após trauma de medula espinal. Nakajima et al. (2012) e Hawryluk et al. (2012) também observaram redução na expressão de TNF α em animais submetidos a trauma de medula espinal e tratados com células-tronco. Entretanto, esses autores não descreveram os mecanismos pelos quais as células-tronco reduzem a produção de TNF α . No presente estudo acredita-se que o aumento na expressão de IL-10 no grupo CTM pode ter reduzido o infiltrado inflamatório e por consequência a produção de TNF α oito dias após trauma. Essa hipótese foi embasada nos estudos de Wirjatijasa et al. (2002) e Ledebøer et al. (2000) os quais relataram que a administração de IL-10 diminui a produção de TNF α por células da micróglia e astrócitos ativados.

Semelhante ao TNF- α , a IL-1 β induz inflamação e desregula a liberação de outras citocinas, levando à morte neuronal e de oligodendrócitos (Shamash et al., 2002). A redução na produção de IL-1 β ocorreu apenas aos 21 dias no grupo tratado com duas aplicações de CTM, sendo atribuído à essa segunda aplicação a redução na produção desta interleucina. De fato, a redução da IL-1 β não ocorre por incremento nas concentrações da IL-10 (Ledebøer et al., 2000; Wirjatijasa et al., 2002), provavelmente pois após a lesão espinal, os astrócitos constituintes da barreira hematoencefálica (BHE) sejam os responsáveis pela produção de IL-1 β e não as células do infiltrado inflamatório (Ledebøer et al. 2000; Lau e Yu., 2001), reduzindo a capacidade de ação das CTM sob as células da BHE após única administração endovenosa.

Paralelamente à modulação da resposta imune, os grupos tratados com CTM demonstraram aumento na expressão de neurotrofinas. No grupo controle houve maior expressão de TGF- β 24 horas e 21 dias após o trauma, de forma significativamente maior que o observado nos grupos tratados com as CTM, portanto os transplantes de CTM três horas após lesão espinal ou três horas e sete dias após lesão, foram capazes de reduzir a produção desta neurotrofina. O TGF- β é um fator neurotrófico conhecido por sua ação na reparação de lesões teciduais, por isso sua expressão aumenta nos primeiros dias após o trauma medular (Nakamura et al., 2003; Spitzbarth et al., 2011; Hawryluk et al, 2012). Apesar de não ter sido identificado qual mecanismo foi responsável por esse achado, no tempo de avaliação 24 horas a IL-10 pode ter sido uma das responsáveis, pois ela atingiu maiores concentrações nesse mesmo grupo e tempo de avaliação. O TGF- β tem algumas ações contrárias às da IL-10, como aumentar a expressão de moléculas de adesão e ativar células da micróglia e macrófagos com fenótipo pró-inflamatório (Wirjatijasa et al., 2002; Chen et al., 2015). Dessa forma, o aumento na expressão de TGF- β 24 horas após o trauma no grupo controle pode ter sido a causa do maior infiltrado inflamatório observado nesse grupo. Ressalta-se que esse infiltrado foi constituído predominantemente por células com formato ameboide, com citoplasma denso e sem ramificações, características morfológicas de

macrófagos do tipo pró-inflamatórios. No tempo de avaliação 21 dias a menor expressão de TGF- β nos grupos tratados com CTM pode ser atribuída à redução de astrócitos ativados observada nesses grupos no mesmo tempo de avaliação. Essa hipótese se baseia nos resultados de Wirjatijasa e colaboradores (2002) e Kohta e colaboradores (2009), que demonstraram que os astrócitos são os principais produtores dessa citocina. Como o TGF- β , por ação autócrina, induz a proliferação e ativação de astrócitos, a redução observada nos grupos tratados com CTM promove a redução da cicatriz glial, que funciona como uma barreira física, impedindo a regeneração dos axônios (Bethea e Dietrich, 2002; Wang e Shuaib, 2002) e, portanto, promove menor área de lesão, estimulando a recuperação funcional (Kohta et al., 2009).

O aumento na produção dos fatores neurotróficos BDNF, GDNF e VEGF tem sido apontado como um dos principais mecanismos de ação pelo qual o transplante de CTM promove bons resultados após lesão espinal (Novikova et al., 1996; Dolbeare e Houle, 2003; Gu et al., 2010; Nakano et al., 2010; Zhukareva et al., 2010; Hawryluk et al., 2012; Zhou et al., 2013; Lin et al., 2014; Mead et al., 2014), entretanto, apenas após a segunda administração de CTM houve aumento da produção de BDNF, sobretudo 24 horas após a segunda aplicação, tempo de oito dias após a lesão. Esse aumento na produção de BDNF pode justificar os elevados escores na escala BBB observados nos tempos 14 e 21 dias no grupo que recebeu duas doses de CTM. Enquanto Lu et al. (2005) não observou correlação entre o aumento de BDNF e a recuperação funcional, Osaka et al. (2010) correlacionaram os níveis maiores de BDNF com o melhor desempenho da atividade motora.

A ausência de incremento na produção de BDNF nos animais tratados com apenas uma dose de CTM foi semelhante ao relatado por outros pesquisadores (Lu et al., 2005; Hawryluk et al., 2012; Abdanipour et al., 2014; Mead et al., 2014), contudo existem divergências em relação à expressão de BDNF após o uso de células-tronco, havendo registros de aumento de sua produção (Osaka et al., 2010; Kim et al., 2013; Silva, 2013; Kingham et al., 2014; Zhou et al., 2013). Uma explicação para essa divergência pode ser o momento da administração das CTM após o trauma, pois as células modificam seu perfil de secreção de acordo com os estímulos presentes no ambiente em que são transplantadas (Zhukareva et al., 2010; Abdanipour et al., 2014; Mead et al., 2014).

O BDNF, dentre outros fatores, é considerado essencial para promover sobrevivência neuronal (Webb et al., 2010). Juntamente com NT-3, o BDNF induz o crescimento de neuritos e aumentam a expressão de enzimas que sintetizam neurotransmissores, além de inibir a apoptose neuronal (Mocchetti e Wrathall, 1995; Balaratnasingam e Janca, 2012). Outras neurotrofinas também são correlacionadas com a inibição da apoptose neuronal e com a melhor recuperação da função motora dos membros pélvicos. Foi relatado que o GDNF promove proteção de neurônios dopaminérgicos na substância nigra (Gill et al., 2003; Ren et al., 2013) e neurônios motores do corno ventral da medula espinal (Pastor et al., 2012). No presente estudo as CTM estimularam a expressão de GDNF nos tempos de avaliação 72 horas e oito dias após o trauma nos dois grupos tratados com CTM e ainda com 21 dias no grupo tratado com dupla administração intravenosa da CTM. Demonstrou-se em estudos prévios que o GDNF aumenta a sobrevivência de neurônios, a retração de axônios seccionados e estimula o rebrotamento axonal (Dolbeare e Houle, 2003; Hawryluk et al., 2012; Abdanipour et al., 2014; Lin et al., 2014). A administração de GDNF após trauma de medula espinal favorece a recuperação da função motora (Zhang et al., 2013; Abdanipour et al., 2014). Portanto, o aumento de GDNF promovido pelas CTM pode ter contribuído para maior sobrevivência neuronal, menor degeneração da substância branca e pela recuperação da função motora observados nestes grupos. Não é

possível afirmar se as CTM produziram GDNF ou se elas estimularam as células do parênquima medular a fazê-lo. Todavia, o aumento na expressão dessa neurotrofina provavelmente contribuiu para os resultados obtidos no grupo CTM, principalmente devido às diferenças encontradas com 21 dias entre os grupos tratados com CTM, os quais apresentaram maior pontuação na escala BBB nos mesmos tempos em que tiveram aumento na produção de GDNF e BDNF, indicando uma melhor resposta à dupla aplicação de CTM após lesão espinal.

Os grupos tratados com duas aplicações de células apresentaram maior expressão de VEGF, tanto no 8º quanto no 21º dia após lesão espinal. Este aumento diferiu significativamente com o grupo de única administração de CTM no tempo de avaliação de oito dias. O grupo que recebeu apenas uma aplicação de células só apresentou diferença significativa quanto ao aumento na produção de VEGF no 21º dia após a lesão. O VEGF é uma proteína conhecida por estimular a angiogênese e aumentar a permeabilidade vascular. A angiogênese exerce papel importante no trauma de medula espinal, pois ela reduz a isquemia e fornece o suprimento sanguíneo necessário para a regeneração de axônios e recuperação da função motora. (Figley et al., 2014; Li et al., 2014). De acordo com Lutton et al. (2012), a maior concentração de VEGF está associada à redução da degeneração secundária ao trauma medular. Fatores pró-angiogênicos como o VEGF são secretados pelas CTM e podem resultar em benefícios em casos de trauma medular devido à redução da hipóxia tecidual no local da lesão e perilesional, além de permitir reparação mais eficiente do tecido danificado (Kinnaird et al., 2004; Nandoe et al., 2009). De fato, Nandoe et al. (2009) obtiveram correlação positiva entre a expressão de VEGF bem como aumento na concentração do VEGF e melhor recuperação funcional e redução da área de lesão em animais tratados com CTM.

Após o trauma espinal ocorre redução da expressão de VEGF, portanto a utilização de terapias que aumentem a expressão dessa neurotrofina pode favorecer a recuperação funcional (Hawryluk et al. 2012; Li et al., 2014; Lin et al., 2014; Mead et al., 2014). Porém, se por um lado o VEGF aumenta a perfusão e favorece os processos relacionados com a reparação tecidual, do outro ele pode agravar a hemorragia, o edema e o infiltrado inflamatório. Essas alterações são mais frequentes com o aumento de VEGF na fase aguda, quando ainda existe ruptura da barreira hemato-espinal (An et al., 2010; Shinozaki et al., 2014). A expressão de VEGF foi maior nos tempos oito e 21 dias no grupo com dois tratamentos de CTM e no tempo 21 dias maior no grupo com um tratamento de CTM. Ressalta-se que o aumento do VEGF ocorreu apenas na fase crônica, isto é no período em que iniciam-se os processos de reparação tecidual. Resultado semelhante foi encontrado por Silva (2013) e Li et al. (2014) que após a administração de células-tronco, obtiveram um aumento na expressão local de VEGF somente na fase crônica do trauma. No trabalho de Li et al. (2014) demonstrou-se que esse aumento estimulou a angiogênese e a recuperação da função motora.

Estudos recentes demonstraram que o VEGF também possui ação neuroprotetora e neurotrófica direta. Ele aumenta a sobrevivência dos neurônios e estimula o rebrotamento axonal (Figley et al., 2014; Mead et al., 2014; Shinozaki et al., 2014). No presente estudo o aumento na expressão de VEGF nos grupos que receberam CTM também foi associado à maior quantidade de neurônios íntegros, menor degeneração da substância branca e à recuperação na função motora. Embora Quertainmont et al. (2012) tenham observado maior tendência dos grupos tratados com CTM em expressar VEGF, os autores não consideraram suficiente para o aumento da densidade de vasos sanguíneos observados nos cortes histológicos. No entanto, é de notório saber que outros fatores tróficos secretados pelas CTM como bFGF, BMP-2, IL-6, MCP-1 e angiogenina, além de fatores anti-apoptóticos, aumentam a sobrevivência das células endoteliais e favorecem a

angiogênese (Mautès et al., 2000; Potapova et al., 2007; Nandoe et al., 2009; Quertainmont et al., 2012).

Inúmeras são as pesquisas que obtiveram recuperação funcional após o tratamento do trauma de medular com CTM. Algumas observações foram encontradas por esses autores para justificar esse resultado como redução do infiltrado inflamatório, da apoptose de neurônios, aumento na quantidade de tecido preservado e do rebrotamento axonal (Dasari et al. 2007; Ide et al., 2010; Osaka et al., 2010; Nakajima et al., 2012; Kim et al., 2013; Shin e tal., 2013; Zhou et al., 2013; Zhang & He, 2014). Entretanto, o mecanismo de ação das CTM para promover esses resultados não foi descrito.

Os resultados do presente trabalho demonstram recuperação funcional associada ao tratamento em dose única e, melhor desempenho funcional após dupla administração de CTM. As CTM reduziram o infiltrado inflamatório oito dias após o trauma de medula espinal. Acredita-se que o aumento de IL-10 no tempo de avaliação 24 horas, oito e 21 dias diminuiu a permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão, o que resultou em menor infiltrado inflamatório. Além disso, houve menor expressão de TGF- β , que é uma neurotrofina que favorece o infiltrado inflamatório.

Adicionalmente, nos grupos tratados com CTM, células da micróglia/macrófagos com fenótipo anti-inflamatório foram observadas já com oito dias após lesão. Estas células apresentaram formato arredondado, com citoplasma volumoso, repleto de debris de mielina, sugerindo alta atividade fagocitária. O aumento da IL-10 também pode ter sido responsável pela maior ativação de células com este fenótipo. Por outro lado, nesse mesmo tempo de avaliação, no grupo controle o infiltrado inflamatório consistiu de células com fenótipo pró-inflamatório, células, ameboides, de citoplasma pequeno e com baixa atividade fagocitária. Nesse mesmo grupo houve maior expressão de TGF- β e menor expressão de IL-10 24 horas após a lesão espinal, que podem ser apontados como os responsáveis pela ativação dessas células.

As CTM reduziram a quantidade de astrócitos ativados 21 dias após trauma. Nesse mesmo tempo de avaliação houve redução de TGF- β , cuja uma das funções é a ativação de astrócitos para formar a cicatriz glial.

A redução na marcação de neurônios pelo anticorpo anti-NeuN oito dias após trauma no grupo CTM pode não estar associada a morte neuronal, pois essas células apresentaram características de neurônios íntegros à avaliação histopatológica. Além disso, no tempo de avaliação de 21 dias a marcação pelo anticorpo anti-NeuN foi maior nos grupos tratados com CTM. Acredita-se que os neurônios foram submetidos a alguma alteração metabólica que reduziu a expressão da proteína NeuN oito dias após trauma, mas que não resultou na morte desses neurônios, conforme visibilizado aos 21 dias. Unal-Cevik e colaboradores (2004) observaram redução na expressão da proteína NeuN em neurônios submetidos à isquemia, mas sem ocorrer morte dessas células posteriormente. No presente estudo, a maior quantidade de neurônios íntegros observados 21 dias após o trauma foi associada à menor expressão de TNF- α e a aumento de GDNF e VEGF em ambos os grupos tratados com CTM e ainda BDNF no grupo que recebeu duas aplicações de CTM. O TNF- α induz a apoptose neuronal (Yune et al., 2003), portanto a sua redução pode ter prevenido a morte neuronal. O VEGF protege neurônios contra a isquemia, favorecendo a sobrevivência neuronal (Shinozaki et al., 2014). Aliado às expressões de GDNF e BDNF, o aumento de VEGF pode ter sido responsável pela maior sobrevivência de neurônios 21 dias após a lesão espinal.

As CTMs reduziram a degeneração da substância branca nesses mesmos tempo de avaliação. Esse resultado provavelmente ocorreu devido à soma de diferentes fatores. ter sido alcançado devido a um conjunto de fatores. A redução do infiltrado inflamatório pode ter diminuído a liberação de moléculas citotóxicas como proteases, óxido nítrico e espécimes reativos derivados do oxigênio, ou seja, diminuiu os danos a substância branca. Além disso, houve menor expressão de TNF- α que é uma citocina que provoca desmielinização (Wang e Shuaib, 2002). Por outro lado o aumento na expressão de GDNF pode ter reduzido a degeneração axonal, e por consequência também da mielina, pois está neurotrofina é capaz de reduzir a retração de axônios seccionados e estimular brotamento axonal (Dolbeare e Houle, 2003)

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a administração precoce de CTM criopreservadas por via intravenosa aumenta a concentração da citocina anti-inflamatória IL-10, reduz as citocinas pró-inflamatória TNF- α e o fator neurotrófico TGF- β quando em única administração e, quando em duas aplicações reduz ainda a citocina pró-inflamatória IL-1 β . As CTM também aumentam a expressão dos fatores neurotróficos GDNF e VEGF em único tratamento e GDNF, VEGF e BDNF no tratamento duplo após lesão espinal. Esses resultados foram associados aos efeitos imunomodulatório e neuroprotetor das CTM e à ação das CTM quando da segunda administração, sobre o controle dos eventos inflamatórios que ocorrem em segundo momento com sete dias após lesão espinal. O duplo tratamento com CTM permite obter melhores resultados quanto à recuperação funcional e secreção de neurotrofinas do que a aplicação única, devendo ser considerado promissor a possibilidade de mais de um momento de aplicação intravenosa de CTM após lesão espinal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de CTM resulta em melhor recuperação funcional correlacionada com controle do processo inflamatório e aumento da expressão de neurotrofinas. Diversas estratégias terapêuticas surgem a partir destas comprovações, contudo é necessário concentrar esforços para estabelecer a melhor via de administração e as janelas terapêuticas, considerando uma ou mais aplicação de CTM.

Apesar de neste estudo não se encontrar evidências de reação ao transplante alogênico, se faz necessário ampliar as investigações acerca desta modalidade terapêutica.

Os resultados obtidos contribuirão para despertar novas pesquisas sobre de tratamentos duplos ou múltiplos com CTM após lesão espinal. Adicionalmente, investigações pormenorizadas são estimuladas para demonstrar se as CTM contribuem diretamente produzindo os fatores neuroprotetores e as citocinas ou se as mesmas são indutoras de estimulação das células presentes no próprio tecido nervoso e infiltrado inflamatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDANIPOUR, A. Intraspinal transplantation of motoneuro-like cell combined with delivery of polymer-based glial cell line-derived neurotrophic factor for repair of spinal cord contusion injury. *Neural Regen. Res.*, v. 9, n. 10, p. 1003-1013, 2014.

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. Neuroscience*, v. 16, p. 1052-1055, 2009.

ALLEN, A.R. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column a preliminary report. *J. Am. Med. Assoc.*, v.57, p.878-880, 1911.

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

ANDERSON, S.A.; GLOD, J.; ARBAB, A.S., et al. Noninvasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model. *Blood*, v. 105, p. 420–425, 2005.

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

ARAS, Y.; SABANCI, P.A.; KABATAS, S.; DURUKSU, G.; SUBASI, C.; ERGUVEN, M.; KARAOZ, E. The effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation during the acute and subacute phases following spinal cord injury. *Turk Neurosurgery*, v.26, n.1, p.127-139, 2016.

ARIAS, M. V. B.; SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, p. 115-134, 2007.

ASSIS, A. C. M.; CARVALHO, J. L.; JACOBY, B. A. et al. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell Transplantation*, v. 19, p. 219–230, 2010.

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.

BALCI, D.; CAN, A. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, v. 8, n. 1, p. 60-72, 2013.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 36, n. 4, p. 568-584, 2004.

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, 1996.
- BEATTIE, M. S.; SHUMAN, S. L.; BRESNAHAN, J. C. Review: apoptosis and spinal cord injury. *The Neuroscientist*, v. 4, n. 3, p. 163-171, 1998.
- BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. A review of experimental and clinical treatments for acute spinal cord injury. *Vet. Med.*, v. 95, p. 855-866, 2000a.
- BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. Acute spinal cord trauma: mechanisms and clinical syndromes. *Veterinary Medicine*, v. 95, n. 11, p. 846-850, 2000b.
- BETHEA, J. R.; NAGASHIMA, H.; ACOSTA, M. C. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma*, v. 16, p. 851-863, 1999.
- BETHEA, J.R.; DIETRICH, D. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Current opinion in Neurology*, v.15, p.355-360, 2002.
- BLIGHT, A. R. New drugs for spinal trauma. *Am. Col. Vet. Int. Med. Forum*, v. 18, p. 292-293, 2000.
- BOELONI, J. N. Efeitos in vivo e in vitro dos hormônios tireoidianos na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. 2012. 226f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária-UFMG, Belo Horizonte.
- BOURIN, P.; BUNNELL, B. A.; CASTEILLA, L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, v. 15, n. 6, p. 641-648, 2013.
- BRADBURY, E. J.; CARTER, L. M. Manipulating the glia scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain Research Bulletin*, v. 84, n. 4, p. 306-316, 2011.
- BRAUND, K. G.; SHORES, A.; BRAWNER, W. R. Jr. The etiology, pathology, and pathophysiology of acute spinal cord trauma. *Veterinary Medicine*, v. 85, n. 7, p. 684-691, 1990.
- BRAVO, M. O. Isolamento, expansão e caracterização de células-tronco do tecido adiposo de equinos. *Ars Veterinaria*, v. 28, n. 22, p. 66-74, 2012.
- BREWER, K. L.; BETHEA, J.R.; YEZIERSKI, R.P. Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, v. 159, n. 2, p. 484-493, 1999.
- BRUDER, S. P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E., et al. Growth kinetics, self-renewal, and osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell Biochem.*, v. 4, n. 2, p. 278-294, 1997.

- 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.
- CANTINIEAUX, D.; QUERTAINMONT, R.; BLACHER, S.; ROSSI, L.; WANET, T.; NOËL, A.; BROOK, G.; SCHOENEN, J.; FRANZEN, R. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *Plos One*, v.8, n.8, p.e69515, 2013.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- 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, n.5, p. 617-625, 2013.
- CARVALHO, P. H. Avaliação neurológica e histológica de lesão compressiva da medula espinal de ratos Wistar tratados com células-tronco mesenquimais. 2011. 79f. Dissertação (Magister scientiae em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CHEN L, TREDGET EE, LIU C, WU Y. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *Plos One*. v.4, n.9, p.e7119, 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, S.H.; OYARZABAL, E.A.; SUNG, Y.F.; et al. Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. *Glia*, v.63, n. 1, p.1-14, 2015.
- CHEREDNICHENKO, G.; WARD, C. W.; FENG, F. et al. Enhanced excitation-coupled calcium entry in myotubes expressing malignant hyperthermia mutation R163c is attenuated by dantrolene. *Mol. Pharmacol.*, v. 73, p. 1203–1212, 2008.
- CHERIYAN, T.; RYAN, D.J.; WEINREB, J.H. Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord*, v.52, p.588-595, 2014.
- CHOUDHERY, M.S.; BADOWSKI, M.; MUISE, A.; PIERCE, J.; HARRIS, D.T. Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine. *J. Surgical Research*. v.187, n.1. p.24-35, 2014.
- CHOUMERIANOU, D. M.; DIMITRIOU, H.; KALMANTI, M. Stem Cells: promises versus limitations. *Tissue Engineering part B*, v. 14, n. 1, p. 53-60, 2008.
- CLINICAL TRIALS, A service of the U. S. National Institutes of Health, 2016. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov>> Acesso em: 12 janeiro de 2016.
- Cloud BA, Ball BG, Chen B, Knight AM, Hakim JS, Ortiz AM et al. Hemisection spinal cord injury in rat: the value of intraoperative somatosensory evoked potential monitoring. *J Neurosci Methods*, v.211, p.179–184, 2012.

- COLEMAN, W. P.; BENZEL, D.; CAHILL, D. W. et al. A critical appraisal of the reporting of the National Acute Spinal Cord Injury Studies (II and III) of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *J. Spinal Disord.*, v. 13, n. 3, p. 185–99, 2000.
- COVAS, D. T.; SIUFI, J. L.; SILVA, A. R. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 36, p. 1179-1183, 2003.
- DARIOLLI, R.; BASSANEZE, V.; NAKAMUTA, J. S., et al. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation. *Plos One*, v. 8, n. 7, p. e67939, 2013.
- 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.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hemat.*, v. 28, p. 875-884, 2000.
- DOLBEARE, D.; HOULE, J.D.; Restriction of axonal retraction and promotion of axonal regeneration by chronically injured neurons after intraspinal treatment with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *J. Neurotrauma*, v.20, p.1251-1261, 2003.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, p. 315-317, 2006.
- DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp. Neurology*, v. 209, p. 378-388, 2008.
- DUCKER, T. B.; ZEIDMAN, S. M. Spinal cord injury. Role of steroid therapy. *Spine*, v. 19, n. 20, p. 2281–2287, 1994.
- DUSART, I.; SCHWAB, M. E. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, v. 6, p. 712-724, 1994.
- FEHLINGS, M.G.; TATOR, C.H.; LINDEN, R.D. The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.*, v. 71, n. 3, p. 403–416, 1989.
- FIGLEY, S.A.; LIU, Y.; KARADIMAS, K.; et al. Delayed administration of a bio-engineered zinc-finger VEGF-A gene therapy is neuroprotective and attenuates allodynia following traumatic spinal cord injury. *Plos one*, v.9, p.1-21, 2014.
- FORTUN, J.; HILL, C. E.; BUNGE, M. B. Combinatorial strategies with Schwann cell transplantation to improve repair of the injured spinal cord. *Neurosci Lett*, v. 456, n. 3, p. 124–132, 2009.
- FRANÇOIS, M.; COPLAND, I. B.; YUAN, S., et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interfero-gama licensing. *Cytotherapy*, v. 14, n. 2, p. 147-152, 2012.

- FREY, N.V.; LAZARUS, H.M.; GOLDSTEIN, S.C. Has allogeneic stem cell cryopreservation been given the cold shoulder? An analysis of the pros and cons of using frozen versus fresh stem cell products in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. V.38, p.399-405, 2006.
- FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, v. 3, n. 4, p.393-403, 1970.
- GAO, F.; CHIU, S. M.; MOTAN, D. A. L., et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death and Disease*, v. 7, p. e2062, 2016.
- GAVIRIA, M.; PRIVAT, A.; D'ARBIGNY, P. et al. Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, Gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Res.*, v. 874, n. 2, p.200–209, 2000a.
- GAVIRIA, M.; PRIVAT, A.; D'ARBIGNY, P. et al. Neuroprotective effects of gacyclidine after experimental photochemical spinal cord lesion in adult rats: dose-window and time-window effects. *J. Neurotrauma*, v. 17, n. 1, p. 19–30, 2000b.
- GILL, S. S.; PATEL, N. K.; HOTTON, G. R. et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat. Med.*, v. 9, p. 589–595, 2003.
- GOH, B. C.; THIRUMALA, S.; KILROY, G. et al. Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v. 1, n. 4, p. 322-324, 2007.
- GOSSARD, J.P.; DELIVET-MONGRAIN, H.; MARTINEZ, M.; KUNDU, A. et al. Plastic Changes in lumbar locomotor networks after a partial spinal cord injury in cats. *J. Neurosci.*, v.35, n.25, p.9446-9455, 2015.
- GRUNER, J.A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma*, v.9, p.123-128, 1992.
- GU, Z.; AKIYAMA, K.; MA, X.; ZHANG, H.; FENG, X. et al. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Lupus*, v.19, n.13, p.1502-1514, 2010.
- 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.
- GUTIERREZ, J.; LAMANNA, J.J.; GRIN, N.; HURTIG, C.V. Preclinical validation of multilevel intraparenchymal stem cell therapy in the porcine spinal cord. *Neurosurgery*, v.77, n.4, p.604-612, 2015.
- GWAK, M.; PARK, P.; KIM, K. et al. The effects of dantrolene on hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain. *Anesth. Analg.*, v. 106, p. 227–233, 2008.
- HAAS, S.; WEIDNER, N.; WINKLER, J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr. Opin. Neurol.*, v. 18, p. 59-64, 2005.

- HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, v. 23, p. 263-280, 2006.
- HAINS, B. C.; YUCRA, J. A.; HULSEBOSCH, C. E. Reduction of pathological and behavioral deficits following spinal cord contusion injury with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398. *J. Neurotrauma*, v. 18, n. 4, p. 409-423, 2001.
- HALL, E.D. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *Journal of Neurosurgery*, v. 76, p. 13-22, 1992.
- HARRIS, V.K.; YAN, Q.J.; VYSHKINA, T.; SAHABI, S.; LIU, X.; SADIG, S.A. Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, v.313, n.1-2, p.167-177, 2012.
- HAUSMANN, O. N. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, v. 41, p. 369-378, 2003.
- HAWRYLUK, G.W.J.; MOTHE, A.; WANG, J.; et al. An In vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev.*, v.21, p. 2222-2238, 2012.
- HEIMBURGER R. Return of function after spinal cord transection. *Spinal Cord*, v.43, p. 438-440, 2005.
- HERMANN, R.; STURM, M.; SHAW, K.; PURTILL, D.; COONEY, J.; WRIGHT, M.; PHILIPS, M.; CANNEL, P. Mesenchymal stromal cell therapy for steroid refractory acute and chronic graft versus host disease: a phase 1 study. *International Journal of Hematology*, v.95, n.2, p.182-188, 2012.
- HERRERA, J. J.; HAYWOOD-WATSON II, J. L.; GRILL, R. J. Acute and chronic deficits in the urinary bladder after spinal contusion injury in the adult rat. *J. Neurotrauma*, v. 27, p. 423-431, 2010.
- HILL, J.M.; DICK, A.J.; RAMAN, V.K., et al. Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation*, v. 108, p. 1009-1014, 2003.
- HONMA, T.; HONMOU, O.; IIHOSHI, 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.
- 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, 2010a.
- HU, S.L.; LUO, H.S.; LI, J. T., et al. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Crit. Care Med.*, v. 28, n. 11, p. 2181-2189, 2010b.
- Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ. J. Surg.*, v.79, p.235-244, 2009.

- HURLBERT, R. J. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *Journal of Neurosurgery*, v. 93, n. 1 suppl., p. 1–7, 2000.
- HURLBERT, R. J. The role of steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine*, v. 26, n. 24 suppl., p. S39–46, 2001.
- HURWITZ, Z. M.; IGNOTZ, R. A.; ROWIN, C. et al. Seroma formation in rat latissimus dorsi resection in the presence of biologics: the role of quilting. *Ann. Plast. Surg.*, v. 72, p. 128-130, 2014.
- IDE, C.; NAKAI, Y.; NAKANO, N. et al. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. *Brain Res.*, v. 1332, p. 32-47, 2010.
- ITO, D.; IBANEZ, C.; OGAWA, H, et al. Comparison of cell populations derived from canine olfactory bulb and olfactory mucosal cultures. *Am. J. Vet. Res.*, v. 67, n. 6, p. 1050–1056, 2006.
- IWANAMI, A.; KANEKO, S.; NAKAMURA, M. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J. Neurosci. Res.*, v. 80, n. 2, p. 182-190, 2005.
- JARROCHA, D.; MILCZAREK, O.; WEDRYCHOWICZ, A. et al. Continuous improvement after multiple mesenchymal stem cell transplantations in a patient with complete spinal cord injury. *Cell Transplantation*, v.24, p.661-672, 2015.
- JEFFERY, N.; PENDERIS, J.; SMITH, P.M. et al. Bridging the divide: spinal cord repair by cellular transplantation-from research laboratory to therapeutic application. *J. Small A. Pract.*, v. 42, p. 428-432, 2001.
- JENDELOVÁ, P.; HERYNEK, V.; URDŽÍKOVÁ, L. et al. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J. Neurosc. Res.*, v. 76, p. 232-243, 2004.
- JIA, Y.; WU, D.; ZHANG, R., et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing the Shh transgene promotes functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neurosci. Lett.*, v. 573, p. 46-51, 2014.
- JUNG, D.I.; HA, J.; KANG, B.T.; KIM, J.W. et al. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences*, v.285, p.67-77, 2009.
- KANG, E.S.; HA, K.Y.; KIM, Y.H. Fate of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells following spinal cord injury in rats by transplantation routes. *J. Korean Med. Sci.*, v.27, n.6, p.586-693, 2012.
- KARUSSIS, D.; KARAGEORGIU, C.; VAKNIN-DEMBINSKY, A., et al. Safety and immunological effects os mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurology*, v. 67, n. 10, p. 1187-1194, 2010.
- KARUSSIS, D.; KASSIS, I.; KURKALLI, B. G. S. et al. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases. *J. Neurol. Scienc.*, v. 265, p. 131-135, 2008.

- KEIRSTEAD, H. S.; NISTOR, G.; BERNAL, G. et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v. 25, n. 19, p. 4694-4705, 2005.
- KIM, J.W.; HÁ, K.Y.; MOLON, J.N.; KIM, Y.H. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats. *Spine*, v.38, n.17, p.E1065-E1074, 2013.
- KINGHAM, P. J.; KALBERMATTEN, D. F.; MAHAY, D. et al. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology*, v.207, n.2, p.267–274, 2007.
- KINGHAM, P.J.; KOLAR, M.K.; NOVIKOVA, L.N.; et al. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev.*, v.23, n.7, p.741-754, 2014.
- KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M. S. et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation Research*, v. 94, n. 5, p. 678–685, 2004.
- Kishk NA, Gabr H, Hamdy S, Afifi L, Abokresha N, et al. Case Control Series of Intrathecal Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Therapy for Chronic Spinal Cord Injury. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, v.24, p.702–708, 2010.
- KNOBLAUCH, S. M.; FADEM, A. L. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp. Neurol.*, v. 153, N. 1, p. 143-151, 1998.
- KOBAYASHI, S.; BANNISTER, M. L.; GANGOPADHYAY, J. P. et al. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 280, p. 6580–6587, 2005.
- KOCOGULLARI, C. U.; EMMILER, M.; CEMEK M, et al. Can dantrolene protect spinal cord against ischemia/reperfusion injury? An experimental study. *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 56, p. 406–411, 2008.
- KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J. D. et al. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 24, p. 1613-1619, 2006.
- KOHTA, M.; KOHMURA, E.; YAMASHITA, T. Inhibition of TGF- β 1 promotes functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscience Res.*, v. 65, n. 4, p. 393-401, 2009.
- KRASSIOUKOV, A.V.; ACKERY, A.; SCHWARTZ, G. et al. An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. *Brain Res. Prot.*, v.10, p.60-82, 2002.
- KUBE, S. A.; OLBY, N. J. Managing acute spinal cord injuries. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, v. 30, p. 496-504, 2008.
- KUNDI, S.; BICKNELL, R.; AHMED, Z. Spinal cord injury: current mammalian models. *Am. J. Neurosc.*, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2013.

- KWON, B. K.; TETZLAFF, W.; GRAUER, J. N. et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The Spine Journal*, v. 4, p. 451-464, 2004.
- KWON, B.K.; OXLAND, T.R.; TETZLAFF, W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine*, v.27, p.1504–1510, 2002.
- LAU, L.T.; YU, A.C. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J. Neurotrauma*, v.18, n.3, p.351-359, 2001.
- LAU, L.T.; YU, A.C. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J. Neurotrauma*, v.18, n.3, p.351-359, 2001.
- LECOUTEUR, R. A. Spinal cord and vertebral column trauma. In: *International Veterinary and Critical Care Symposium*, 6, 1998, San Antonio. Proceedings San Antonio : IVECCS, p. 291-295, 1998.
- LEDEBOER, A.; BREVÉ, J.J.P.; POOLE, S.; et al. Interleukin-10, Interleukin-4, and transforming growth factor- β differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*, v.30, p.134-142, 2000.
- 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. USA.*, v. 107, p. 3340–3345, 2010.
- LI, G. L.; BRODIN, G.; FAROOQUE, M. et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*, v. 55, n. 3, p. 280-289, 1996.
- LI, Z.; GUO, G.H.; WANG, C.X.; et al. Influence of neural stem cell transplantation on angiogenesis in rats with spinal cord injury. *Genet mol res.*, v.13, p.6083-6092, 2014.
- LIN, W.; LI, M.; LI, Y.; et al. Bone marrow stromal cells promote neurite outgrowth of spinal motor neurons by means of neurotrophic factors in vitro. *Neurol. Sci.*, v.35, p.449-457, 2014.
- LIU H, KEMENY DM, HENG BC, OUYANG HW, MELENDEZ AJ, et al. The Immunogenicity and Immunomodulatory Function of Osteogenic Cells Differentiated from Mesenchymal Stem Cells. *J. Immunol.* v.176, p. 2864–2871, 2006.
- LIU, G.; ZHOU, H.; LI, Y. et al. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*, v. 57, p. 18-24, 2008.
- LIU, X. Z.; XU, X. M.; HU, R. et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* V. 17, p. 5395–5406, 1997.
- LIU, Y.; HE, Z. J.; XU, B. et al. Evaluation of cell tracking effects for transplanted mesenchymal stem cells with jetPEI/Gd-DTPA complex in animal models of hemorrhagic spinal cord injury. *Brain Research*, v. 1391, p. 24-35, 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.
- LOCKE, M.; WINDSOR, J.; DUNBAR, R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ. J. Surg.*, v.79, p.235-244, 2009.
- 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.
- LUTTON, C.; YOUNG, Y. W.; WILLIAMS, R. et al. Combined VEGF and PDGF treatment reduces secondary degeneration after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, v.29, n. 5, p. 957-970, 2012.
- 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.
- 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.W.L. et al. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, v. 19, p. 1609-1617, 2002.
- MAJUNDER, M.; THIEDE, M.; MOSCA, J. Phenotype and functional comparison of cultured of marrow derived mesenchymal stem cells and stromal cells. *J. Cell Physiol.*, v. 176, p. 57-66, 1998.
- MAMIDI, M.K.; NATHAN, K.G.; SLINGH, G., et al. Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation. *J. Cell Biochem.*, v. 113, n. 10, p. 3153-5164, 2012.
- MARTIN, D.; SCHOENEN, J.; DELREE, P. et al. Experimental acute traumatic injury of the adult rat spinal cord by a subdural inflatable balloon: methodology, behavioral analysis, and histopathology. *J. Neurosci. Res.*, v.32, p.539–550, 1992.
- MAUTES, A. E.; WEINZIERL, M. R.; DONOVAN, F. et al. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Phys. Ther.*, v. 80, p. 673-687, 2000.
- MEAD, B.; LOGAN, A.; BERRY, M.; et al. Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *Plos one*, v.9, p.1-10, 2014.
- MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, A. L.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.
- MEIRELLES, L. S.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 20, p. 419–427, 2009a.

- MEIRELLES, L. S.; NARDI, N. B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci.*, v. 14, p. 4281-4298, 2009b.
- METZ, G.A.S.; CURT, A.; VAN DE MEENT, H.; KLUSMAN, I.; SCHWAB, M.E.; DIETZ, V. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma*, v.17, p.1-17, 2000.
- 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.
- MEZEY, E.; KEYS, S.; VOGELSANG, G. et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 1364-1369, 2003.
- MILWARD, E. A.; LUNDBERG, C. G.; GE, B. et al. Isolation and transplantation of multipotential populations of epidermal growth factor-responsive, neural progenitor cells from the canine brain. *J. Neurosci. Res.*, v. 50, n. 5, p. 862-871, 1997.
- MINGUELL, J. J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, n. 8, p. 881-887, 2000.
- MINONZIO, G.; CORAZZA, M.; MARIOTTA, L.; GOLA, M.; ZANZI, M.; GANDOLFI, E.; DE FAZIO, D.; SOLDATI, G. Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. *Cryobiology*, v.69, p.211-216, 2014.
- 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, n. 2, p. 410-431, 2005.
- MOCCHETTI, I.; WRATHALL, J. R. Neurotrophic factors in central nervous system trauma. *J. Neurotrauma*, v. 5, p. 853-870, 1995.
- MOLL, G.; ALM, J.; DAVIES, L. C. et al. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells*, v. 32, n. 9, p. 2430-2443, 2014.
- MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, R. J.; ARGOLO, N. S. Terapia celular em reparação óssea – Aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. *Ciênc. Vet. Trop.*, v. 11, n. 2 supl., p. 95-100, 2008.
- MORAES, L.; VASCONCELOS-DOS-SANTOS, A.; SANTANA, F. C. et al. Neuroprotective effects and magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells labeled with SPION in a rat model of Huntington's disease. *Stem Cell Res.*, v. 9, n. 2, p. 143-155, 2012.
- MORI, F.; OKADA, M.; TOMIYAMA, M. et al. Effects of ryanodine receptor activation on neurotransmitter release and neuronal cell death following kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res.* v. 65, p. 59-70, 2005.
- 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.

- NAALDIJK, Y.; STAUDE, M.; FEDOROVA, V. et al. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnology*, v. 12, n. 49, p. 1-10, 2012.
- 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.
- NAKAJIMA, H.; UCHIDA, K.; GUERRERO, A.R.; et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v.29, p.1614-1625, 2012.
- NAKAMURA, M.; HOUGHTLING, R.A.; MACARTHUR, L.; et al. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.*, v.184, p.313-325, 2003.
- NAKANO, N.; NAKAI, Y.; SEO, T.B.; et al. Characterization of conditioned medium of cultured bone marrow stromal cells. *Neurosci. Lett.*, v.483, p.57-61, 2010.
- NANDOE TEWARIE, R. D.; HURTADO, A.; RITFELD, G. J. et al. Bone marrow stromal cells elicit tissue sparing after acute but not delayed transplantation into the contused adult rat thoracic spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, v. 26, n. 12, p. 2313–2322, 2009.
- NANDOE TEWARIE, R.D.S.; HURTADO, A.; RITFELD, G.J.; et al. Bone marrow stromal cells elicit tissue sparing after acute but not delayed transplantation into the contused adult rat thoracic spinal cord. *J. Neurotrauma*, v.26, p.2313-2322, 2009.
- NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Exp. Pharmacology*, v. 174, p. 249-282, 2006.
- National Spinal Cord Injury Statistical Center, *2014 Annual Statistical Report for the Spinal Cord Injury Model Systems*. University of Alabama at Birmingham, March, 2015, 94p.
- NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. *Blood*, v. 110, p. 3499-3506, 2007.
- NEIRINCKX, V.; AGIRMAN, G.; COSTE, C.; MARQUET, A. et al. Adult bone marrow mesenchymal and neural crest stem cells are chemoattractive and accelerate motor recovery in a mouse model of spinal cord injury. *Stem Cell Res. Ther.*, v.6, p.1-15, 2015.
- NISHIMURA, S.; YASUDA, A.; IWAI, H.; et al. Time-dependent changes in the microenvironment of injured spinal cord affects the therapeutic potential of neural stem cell transplantation for spinal cord injury. *Mol. Brain*, v.6, 2013.
- NOVIKOVA, L.; NOVIKOV, L.; KELLERTH, J.O. Brain derived neurotrophic factor reduces necrotic zone and supports neuronal survival after spinal cord hemisection in adult rats. *Neurosci. Lett.*, v.220, p.203-206, 1996.
- O'FARRELL, A. M.; LIU, Y.; MOORE, K. W. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.*, v. 17, n. 4, p.1006-1013, 1998.

- OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A. H. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. *Einstein*, v. 2, n. 4, p. 355-358, 2004.
- OKAMURA, R. M.; LEBKOWSKI, J.; AU, M. Immunological properties of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cells. *Journal of Neuroimmunology*, v. 192, p. 134-144, 2007.
- OLBY N.J. Current concepts in the management of acute spinal cord injury. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 13, p. 399-407, 1999.
- OLBY, N. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, v. 40, p. 791-807, 2010.
- OLIVEIRA, K.M.; LAVOR, M.S.L.; SILVA, C.M.O. et al. Omega-conotoxin MVIIC attenuates neuronal apoptosis in vitro and improves significant recovery after spinal cord injury in vivo in rats. *In. J. Clin. Exp. Pathol.*, v.7, p.3524-3536, 2014.
- ONIFER, S. M.; RABCHESVKY, A. G.; SCHEFF, S. W. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR J.*, v. 48, p. 385-395, 2007.
- 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.
- OWEN, M. Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci.*, suppl 10, p. 63-70, 1988.
- PARR, A. M.; TATOR, C. H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplantation*, v. 40, p. 609–619, 2007.
- PASTOR, D.; VISO-LEÓN, M. C.; JONES, J. et al. Comparative effects between bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation in GDNF expression and motor function recovery in a motoneuron degenerative mouse model. *Stem Cell Rev.*, v. 8, n. 2, p. 445-458, 2012.
- PATEL, S.A.; SHERMAN, L.; MUNOZ, J.; RAMESHWAR, P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Archivum immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v.56, n.1, p.1-8, 2008.
- 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.
- PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p. 143-147, 1999.
- PLUNKETT, J.; YU, C. G.; EASTON, J. M. et al. Effects of interleukin-10 on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Exp. Neurol.*, v. 168, n. 1, p. 144-145, 2001.
- POINTILLART, V.; PETITJEAN, M.E.; WIART, L. et al. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord*, v. 38, n.2, p. 71–76, 2000.
- POLLACK, A. Stem cell trial wins approval of F.D.A. *The New York Times*, July, 30, 2010.

- POON, P.C.; GUPTA, D.; SHOICHET, M.S.; TATOR, C.H. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. *Spine*, v.32, p.2853-2859, 2007.
- POPOVICH, P. G.; Longbrake M E. E. Perspectives - Opinion - Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nat Rev Neurosci.*, v. 9, p. 481-493, 2008.
- POTAPOVA, I. A.; GAUDETTE, G. R.; BRINK, P. R. et al. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, v. 25, p.1761–1768, 2007.
- PRASAD, V.K.; LUCAS, K.G.; KLEINER, G.I.; TALANO, J.A.M.; JACOBSON, D.; BROADWATER, G.; MONROY, R.; KURTZBERG, J. Efficacy and Safety of Ex Vivo Cultured Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal™) in Pediatric Patients with Severe Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease in a Compassionate Use Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v.17, n.4, p.534-541, 2011.
- QI, W.; DING, D.; SALVI, R. J. Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cochlear organotypic cultures. *Hear Res.*, v. 236, p. 52–60, 2008.
- QUERTAINMONT, R.; CANTINIEAUS, 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, n. 6, p.e39500, 2012.
- Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, et al. Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans. *Stem Cells and Development.*, v.20, n.8, p.1297-1308, 2011.
- RADA, T.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.*, v.15, p.113-125, 2009.
- RAMSEY, J.B.G.; RAMER, L.M.; INSKIP, J.A.; et al. Care of rats with complete high-thoracic spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v.27, p.1709-1722, 2010.
- RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, v.312, n.12, p.2169 – 2179, 2006.
- REN, Y.; YOUNG, W. M. Managing Inflammation after Spinal Cord Injury through Manipulation of Macrophage Function. *Neural Plasticity*, v. 2013, ID 945034, 9p., 2013.
- REN, Z.; WANG, J.; WANG, S. et al., Autologous transplantation of GDNF-expressing mesenchymal stem cells protects against MPTP-induced damage in cynomolgus monkeys. *Nature Scientific Reports*, v. 3, n. 2786, p. 1-11, 2013.
- RENZI, S.; LOMBARDO, T.; DOTTI, S.; DESSI, S.S.; DE BLASIO, P.; FERRARI, M. Mesenchymal stromal cell cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*. v.10, n.3, p.276-281, 2012.
- RESNICK, D. K.; GRAHAM, S. H.; DIXON, C. E. et al. Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 15, n. 12, p. 1005–1013, 1998.

- ROSADO, I. R. Efeitos do Dantrolene sódico e Succinato de metilprednisolona na neuroproteção e morte celular, na medula espinhal de ratos submetidos a trauma compressivo agudo. 2011. 45f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ROSADO, I.R.; LAVOR, M.S.L.; ALVES, E.G.L. et al. Effects of methylprednisolone, dantrolene, and their combination on experimental spinal cord injury. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v.7, p.4617-4626, 2014.
- ROSENBERG, L.J.; TENG, Y.D.; WRATHALL, J.R. Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin on acute white matter pathology after experimental contusive spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v. 19, n. 14, p. 6122–6133, 1999.
- ROSSIGNOL, S.; DREW, T.; BRUSTEIN, E, et al. Locomotor performance and adaptation after partial or complete spinal cord lesions in the cat. *Prog. Brain Res.*, v.123, p.349-365, 1999.
- ROSSIGNOL, S.; SCHWAB, M.; SCHWARTZ, M. et al. Spinal cord injury: time to move? *J. Neuroscience*, v.27, p.11782-11792, 2007.
- Roussos I, Rodriguez M, Villa'n D, Ariza A, Rodriguez L, et al. Development of a Rat Model of Spinal Cord Injury and Cellular Transplantation. *Transplantation Proceedings*, v.37, p.4127–4130, 2005.
- ROWLAND, J. W.; HAWRYLUK, G. W.; KWON, B. et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg. Focus*, v. 25, n. 5:E2, p. 1-17, 2008.
- RYU, J. K.; DAVALOS, D.; AKASSOGLU, K. Fibrinogen signal transduction in the nervous system. *J Thromb Haemost.*, v. 7, suppl 1, p. 151–154, 2009.
- SANCHEZ-RAMOS, J. R. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J. Neurosc. Res.*, v. 69, p. 880-893, 2002.
- 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. Neuroscience*, v. 29, p. 14932–14941, 2009.
- SAVILLE, L. R.; POSPISIL, C. H.; MAWHINNEY, L. A. et al. A monoclonal antibody to CD11d reduces the inflammatory infiltrate into the injured spinal cord: a potential neuroprotective treatment. *Journal of Neuroimmunology*, v. 156, p. 42-57, 2004.
- SCHÄFFLER, A; BÜCHLER, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, v.25, p. 818–827, 2007.
- SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M.E.; PERRY, V.H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, v.11, p. 3648-4658, 1999a.
- SCHNELL, L.; FEARN, S.; SCHWAB, M.E.; PERRY, V.H.; ANTHONY, D.C. Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.58, p. 245-254, 1999b.

- SCHWARTZ, G.; FEHLINGS, M.G. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J. Neurosurg.*, v. 94, n. 2 suppl., p. 245–256, 2001.
- SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J. Bras. Neurocirurg.*, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.
- 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.
- SEKHON, L.H.S.; FEHLINGS, M.G. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, v.26, p.s2-s12, 2001.
- SENSEBE, L.; TURTE, K.; GALIPEAU, J., et al., Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell*, v.10, n. 1, p. 9-10, 2012.
- SHAKE, J.G. et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann. Thorac. Surg.*, v. 73, n. 6, p. 1919-1926, 2002.
- SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin 1beta. *J. Neurosci.*, v. 22, p. 3052-3060, 2002.
- SHANG, A.J.; HONG, S.Q.; XU, Q., et al. NT-3-secreting human umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantation for the treatment of acute spinal cord injury in rats. *Brain Research*, v. 1391, p. 102-113, 2011.
- SHARMA, H. S.; WINKLER, T.; STALBERG, E. et al. Topical application of TNF-alpha antiserum attenuates spinal cord trauma induced edema formation, microvascular permeability disturbances and cell injury in the rat. *Acta Neurochir. Suppl.*, v. 86, p. 407-413, 2003.
- SHIMAZU, T.; MORI, Y.; TAKAHASHI, A. et al. Serum- and xeno-free cryopreservation of human umbilical cord tissue as mesenchymal stromal cell source. *Cryotherapy*, v.17, p.593-600, 2015.
- SHIN, D.A.; KIM, J.M.; KIM, H.I.; et al. Comparison of functional and histological outcomes after intralesional, intracisternal, and intravenous transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Acta Neurochir.*, v.155, p.1943-1950, 2013.
- SHINOZAKI, M.; NAKAMURA, M.; KONOMI, T.; et al. Distinct roles of endogenous vascular endothelial factor receptor 1 and 2 in neural protection after spinal cord injury. *Neurosci Res.*, v.78, p.55-64, 2014.
- SHORT, D. J.; EL MASRY, W. S.; JONES, P. W. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury—a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord*, v. 38, n. 5, p. 273–86, 2000.
- SHUMAN, S. L.; BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M. S. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord injury in rats. *J. Neurosci. Res.*, v. 50, n. 5, p. 798-808, 1997.

- SILVA, C. M. O. Condroitinase ABC e células-tronco mesenquimais no tratamento de *Rattus norvegicus* submetidos a trauma agudo da medula espinhal. 2013. 80f. (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVA, C.M.O.; MELO, E.G.; ALMEIDA, A.E.R.F. et al. Efeito da prednisona em lesão medula agura experimental em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.641-650, 2008.
- SILVER, J.; MILLER, J. H. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience*. v. 5, p. 146-156, 2004.
- SONG, Q.; XU, R.; ZHANG, Q. et al. Therapeutic effect of transplanting bone mesenchymal stem cells on the hind limbs' motor function of rats with acute spinal cord injury. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, v 7, n. 1, p. 262-267, 2014.
- SPITZBARTH, I.; BOCK, P.; HAIST, V.; et al. Prominent microglial activation in the early proinflammatory immune response in naturally occurring canine spinal cord injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v.70, p.713-714, 2011.
- SREEJIT, P.; DILIP, K. B.; VERMA, R. S. Generation of mesenchymal stem cell lines from murine bone marrow. *Cell Tissue Res.*, v. 350, n. 1, p. 55-68, 2012.
- STOKES, B.T. Experimental spinal cord injury: A dynamic and verifiable injury device. *J. Neurotrauma*, v.9, p.129-131, 1992.
- 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.
- TAKAHASHI, Y.; TSUJI, O.; KUMAGAI, G. et al. Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. *Cell Transplantation*, v. 20, n. 5, p. 727-739, 2011.
- 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, n. 2, p. 69-74, 2007.
- TARTE K, GAILLARD J, LATAILLADE JJ, FOUILLARD L, BECKER M, MOSSAFA H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*, v.115, p.1549–1553, 2010.
- TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neuros.*, v. 75, n.1, p. 15-26, 1991.
- TENG, Y. D.; WRATHALL, J. R. Local blockade of sodium channels by tetrodotoxin ameliorates tissue loss and long-term functional deficits resulting from experimental spinal cord injury. *J. Neurosci.*, v. 17, n. 11, p. 4359–4366, 1997.
- TETZLAFF, W.; OKON, E.B.; KARIMI-ABDOLREZAEE, S. et al. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 28, p. 1611–1682, 2011.

- THIRUMALA, S.; GIMBLE, J.M.; DEVIREDDY, R.V. Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* v.4, n.3, p.224-232, 2010.
- THURET, S.; MOON, L. D. F.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 7, n p. 628-643, 2006.
- TORRES, B. B.; CALDEIRA, F. M.; GOMES, M. G. et al. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal cord after traumatic injury in rats. *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 91, n. 6, p. 530-536, 2010.
- UNAL-CEVIK, I.; KILINÇ, M.; GÜRSOY-OZDEMIR, Y. et al. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.*, v. 1015, p. 169-174, 2004.
- URDZÍKOVÁ, L. M.; RUZICKA, J.; LABAGNARA, M., et al. Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 15, n. 7, p. 11275-11293, 2014.
- URDZÍKOVÁ, L.; JENDELOVÁ, P.; GLOGAROVÁ, K. et al. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma*, v. 23, p. 1379-1391, 2006.
- VANICKÝ, I.; URDZÍKOVÁ, L.; SAGANOVÁ, K.; CÍZKOVÁ, D.; GÁLIK, J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J. Neurotrauma*, v.18, n.12, p.1399-1407, 2001.
- VIOLATTO, M. B.; SANTANGELO, C.; CAPELLI, C., et al. Longitudinal tracking of triple labeled umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cell Research*, v. 15, n. 1, p. 243-253, 2015.
- VON EULER, M.; AKESSON, E.; SAMUELSSON, E. B. et al. Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.*, v.137, n.2, p.242-254, 1996.
- 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,n.2, p.341-352, 2010.
- WANG, C.X.; OLSCHOWKA, J.A.; WRATHALL, J.R. Increase of interleukin-1 β mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. *Brain Res.*, v.759, p.190-196, 1997.
- WANG, C.X.; SHUAIB, A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog. Neurobiol.*, v.67, 161-172, 2002.
- WANG, C.X.; NUTTIN, B.; HEREMANS, H.; et al. Production of tumor necrosis factor in spinal cord following traumatic injury in rats. *J. Neuroimmunol.*, v.69, p.151-156, 1996.
- WANG, L.; LI, Y.; CHEN, J. et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp. Hematol.*, v.30, p.831-836, 2002.

- WANG, X.; HUA, T. C.; SUN, D. W. et al. Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology*, v.55, p.60-65, 2007.
- WEBB, A. A.; NGAN, S.; FOWLER, J. D. Spinal cord injury I: A synopsis of the basic science. *Can. Vet. J.*, v.51, n.5, p.485-492, 2010.
- WEI, X.; YANG, X.; HAN, Z.; QU, F.; SHAO, L.; SHI, Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.34, p.747-754, 2013.
- WIRJATIJASA, F.; DEHGHANI, F.; BLAHETA, R.A.; et al. Interleukin-4, Interleukin-10, and Interleukin-1-receptor antagonist but not Transforming Growth Factor – β induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.*, v.68, p.579-587, 2002.
- 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.
- XU, K.; CHEN, Q.; LI, F. et al. Spinal cord decompression reduces rat neural cell apoptosis secondary to spinal cord injury. *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.*, v.10, n.3, p.180-187, 2009.
- YANG, W. H.; YANG, C.; XUE, Y. Q. et al. Regulated expression of lentivirus-mediated GDNF in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and its neuroprotection on dopaminergic cells in vitro. *PLoS ONE*, v.8, n.5, p.e64389, 2013.
- YAO, S.; CHEN, S.; CLARK, J. et al. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.103, n.18, p.6907-6912, 2006.
- YIU, G.; HE, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, v.7, n.8, p.617-627, 2006.
- YOUNG, W. Molecular and cellular mechanisms of spinal cord injury therapies. In: Kalb RG, Strittmatter SM, editors. *Neurobiology of spinal cord injury*. Totowa: Humana Press, p.241–276, 2000.
- YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F. et al. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC. Bioinformatics*, v.7, n.85, p.1-12, 2006.
- YUNE, T.Y.; CHANG, M.J; KIM, S.J.; et al. Increased production of tumor necrosis factor- α induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma*, v.20, p.207-219, 2003.
- ZHANG, D.; HE, X. A meta-analysis of the motion function through the therapy of spinal cord injury with intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats. *PLoS ONE*, v.9, n.4, p.e93487, 2014.
- ZHANG, R.; ZHANG, K.; LI, J.; LIU, Q.; XIE, J. In vivo tracking of neuronal-like cells by magnetic resonance in rabbit models of spinal cord injury. *Neural. Regen. Res.*, v.8, n.36, p.3373-3381, 2013.

- ZHANG, Y. W.; DENHAM, J.; THIES, R. S. Oligodendrocyte progenitor cells derived from human embryonic stem cells express neurotrophic factors. *Stem Cells Dev.*, v. 15, n. 6, p. 943-952, 2007.
- ZHAO, F.; LI, P.; CHEN, S. R. et al. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. molecular mechanisms and isoform selectivity. *J. Biol. Chem.*, v.276, n.17, p.13810-13816, 2001.
- ZHOU Z.; PENG, X.; INSOLERA, R.; et al. IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp. Neurol*, v.220, p.183-190, 2009.
- ZHOU, Z.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; et al. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytotherapy*, v.15, p.434-448, 2013.
- ZHUKAREVA, V.; OBROCKA, M.; HOULE, J.D.; ET AL. Secretion profile of human bone marrow cells: Donor variability and response to inflammatory stimuli. *Cytokine*, v.50, p.317-321, 2010.
- ZOTTI, A.; GIANESELLA, M.; GASPARINETTI, N. et al. A preliminary investigation of the relationship between the “moment of resistance” of the canine spine, and the frequency of traumatic vertebral lesions at different spinal levels. *Research in Veterinary Science*, v.90, n.2, p.179-184, 2011.
- ZUCCONI, E.; VIEIRA, N.M.; BUENO, D.F. et al. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells Dev.*, v.19, n.3, p.395-402, 2010.
- ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, v.7, p.211-228, 2001.

ANEXOS

Anexo I – Protocolo do CETEA.



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

CERTIFICADO

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

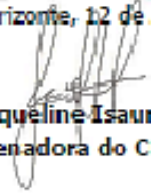
Este certificado expira-se em **11/04/ 2017**.

CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 12 de Abril de 2012.


Prof^ª. **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 2006
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3489-4518

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

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

- 20 Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima, porém há instabilidade do tronco.
- 21 Passo plantar e coordenação consistentes, dedos praticamente não encostam no piso, a pata está paralela no contato inicial e quando animal avança. A cauda está consistentemente para cima e há estabilidade do tronco.