

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Colegiado dos Cursos de Pós Graduação

**EFEITO NEUROPROTETOR DA CONDRITINASE ABC E
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NO TRAUMATISMO
MEDULAR AGUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tatiana Malagoli Taguchi

Belo Horizonte

2014

TATIANA MALAGOLI TAGUCHI

EFEITO NEUROPROTETOR DA CONDRITINASE ABC E
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NO TRAUMATISMO
MEDULAR AGUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

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

Orientadora: Prof.^a Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte

UFMG - Escola de Veterinária

2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã, razões da minha vida e de cada passo no meu caminho. A eles que suportaram minha ausência, e superando a distância, acalmaram meu coração ansioso e me deram apoio pra transpor obstáculos. Cris, pai e mãe, meus melhores amigos, exemplos de caráter, meu porto seguro, meu amor maior. Ao meu tio Adriano, ao Rafael, querido afilhado e Thiago, meu priminho não tão pequeno, que amo e aguardam pacientemente minha chegada. Ao Felipe, que me deu suporte nas dificuldades, colo, amor, me ajudou a crescer, além de tantas alegrias! E também às famílias Nemer e Machado, que me receberam com tanto carinho.

Aos meus amigos - do céu e da terra - que me ajudaram tanto ao longo dessa caminhada. Isabel e Endrigo, agradeço pelos conhecimentos compartilhados - excelentes profissionais, pelos momentos de alegria e pelas dores divididas! Meus "manos" pra vida inteira! Cláudia, minha companheira, professora, amiga, irmã, exemplo! Me entende tão bem, me suporta nos momentos de surto e me motiva quando bate o desânimo! Gabriel, que me abrigou na chegada a BH, cuidou de mim como um irmão, e mesmo longe faz parte do meu cotidiano, meu grande parceiro. Às duas "Paulas" da minha vida: Paula Guedes, companheira de infância e confidente e à Paula Mayer, amiga querida! Ao Felipe Purcell, excelente profissional, e meu *anjo* da guarda! Jaqueline, excelente amiga, companheira! Tiago Tashiro, obrigada pela força quando desanimei, pelos momentos de descontração e ajuda nas dificuldades digitais. À Carine Matias, pelas risadas e apoio nos momentos difíceis! Aos queridos André Wagi, César Costa, João Paulo Puttini, Leonardo Mamão, Kelly Jaqueline, Carine Sanchez, Fernanda Martins, Roberto Pavanelli e Walter Nascimento (Fu), pelo carinho de sempre.

À professora Eliane pela oportunidade do mestrado, por abrir as portas da escola pra mim, mesmo sem me conhecer muito bem. Pela confiança depositada e por todos os ensinamentos, técnicos e pessoais. À toda a equipe de Neurologia da Escola de Veterinária, em especial ao Pablo pela ajuda no laboratório e cirurgias, à Carla pelos conselhos e ensinamentos, ao Mário pelo auxílio no laboratório e análises estatísticas e a Karen. Devo aqui reforçar o agradecimento à Isabel e ao Endrigo, companheiros durante todo o experimento, desde os procedimentos cirúrgicos, análises laboratoriais e estatísticas, até a redação.

À professora Mônica, que além de aceitar compor a banca desta dissertação, foi minha primeira orientadora na Neurologia, e grande exemplo de profissional. Obrigada pelo incentivo e pelos conhecimentos compartilhados! Ao professor Rubens, que

prontamente aceitou o convite para a banca, sempre tão solícito. Às professoras suplentes Ana Carolina Mortari e Natália de Melo Ocarino.

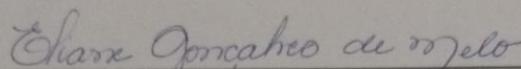
Ao professor Alexandre Martini de Brum pelos tantos ensinamentos durante a residência. Ao professor Fernando de Biasi, meu orientador da graduação, que sempre incentivou a seguir na academia. À professora Ana Paula Bracarense, que me instigou o interesse pela pesquisa, e a minha outra paixão, a oncologia. Ao professor Kleber Moreno, que também me fez despertar tantos interesses. À doutora Evelise Baccarim, quem me inspirou o amor à veterinária.

Agradeço também a todos os funcionários, professores e alunos da Escola de Veterinária da UFMG, que me receberam e participaram da realização deste projeto. Assim como àqueles da Universidade Estadual de Londrina, Universidade de Franca e Instituto Bioethicus, que direta ou indiretamente, participaram da minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

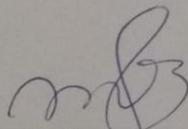
Aos animais que fizeram parte deste experimento. Aos pacientes e proprietários do setor de Neurologia da Escola que me permitiram grande crescimento profissional.

Aos meus querido anjinhos Joaquim, Chica, Nequinha, Kira, Tutti, Mel, Nina, Lady, Pretinha, e ao doutor Ricardo Azama, que cuida deles na minha ausência além da grande amizade.

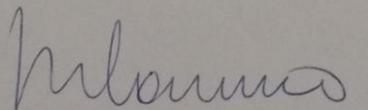
Dissertação defendida e aprovada em 25 de abril de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profª Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador



Profª Mônica Vicky Bahr Arias
Universidade Estadual de Londrina



Prof. Rubens Antônio Carneiro
Escola de Veterinária de UFMG

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
Resumo	12
Abstract	12
1. Introdução.....	12
2. Hipóteses.....	14
2.1 Hipótese Geral.....	14
2.2 Hipóteses Particulares	14
3. Objetivos.....	14
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. Revisão de Literatura.....	15
4.1 Fisiopatogenia do trauma medular agudo	15
4.2 Formação da cicatriz glial e o uso da enzima condroitinase.....	16
4.3 Células tronco mesenquimais e seu uso na neurologia	18
5. Materiais e Métodos.....	20
5.1 Coleta de Tecido Adiposo, Isolamento e Cultivo de CTM.....	20
5.2 Caracterização das CTM por Citometria de Fluxo.....	22
5.3 Diferenciação das CTM <i>in vitro</i>	23
5.4 Aplicação de Condroitinase e células tronco mesenquimais	24
4.4.1 Estudo <i>in vivo</i>	24
5.4.2 Grupos Experimentais.....	24
5.6 Protocolos Anestésico e Cirúrgico, aplicação de Condroitinase ou PBS intramedular.....	25
5.7 Aplicação de CTM ou PBS Intravenosa	26
5.8 Avaliação da Função Motora	27
5.9 Eutanásia.....	29
5.10 Avaliação da expressão gênica relativa do Vimentina ,VEGF, PECAN-1, TGF- β e BDNF por PT-PCR em tempo real.....	29
5.11 Análise estatística	31
6. Resultados.....	32
6.1 Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais	32

6.2 Avaliação clínica dos animais	34
6.3 Avaliação da função motora segundo a escala BBB	34
6.4 Avaliação gênica relativa de vimentina, VEGF, PECAM-1, TGF- β e BDNF por PT-PCR.....	36
7. Discussão	39
8. Conclusões.....	45
9. Considerações finais.....	45
10. Referências.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

%= por cento

µg= micrograma

µL= microlitro

A= adenosina

ANOVA= análise de variância

ATP= adenosina trifosfato

BBB= escala de Basso, Beattie e Bresnahan

BDNF= fator neurotrófico derivado de encéfalo

C= citosina

cDNA= ácido desoxirribonucléico complementar

cm= centímetro

CN= controle negativo

CP= controle positivo

CTM= células tronco mesenquimais

DMEN= *dulbecco's modified eagle medium*

DMSO= dimetilsulfóxido

g= grama

G= guamina

GAG= glicosaminoglicanas

GFP= *green fluorescent protein*

HIF= fator induzido por hipóxia

Kg= quilograma

mg= miligrama

mRNA= ácido ribonucléico mensageiro

PBS= *phosphate buffered saline*

RNA= ácido ribonucléico

PG= proteoglicanas

PGSC= proteoglicana de sulfato de condroitina

PT-PCR= reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

SNC= sistema nervoso central

T= timina

T11= 11^a vértebra torácica

T12= 12^a vértebra torácica

T13= 13^a vértebra torácica

TGF- β = fator transformador de crescimento beta

VEGF= fator de crescimento de endotélio vascular

U= unidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escala de escore para capacidade motora, proposta por Basso, Beatie e Bresnahan em 1995.....pág. 26

Tabela 2. Seqüência de nucleotídeos dos primers iniciadores utilizados para PT-PCR em tempo real.....pág. 29

Tabela 3. Médias de marcação dos anticorpos CD11, CD34, CD45, MHCII, CD73 e CD90, das células tronco mesenquimais utilizadas, pré congelamento, e após descongelamento com 30, 60 e 90 dias de conservação.....pág. 31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicroscopia da cultura celular. (A) Células com formato fusiforme, distribuídas em toda a garrafa de cultura, indicando aderência à superfície. (B) Maior aumento, células fibroblastóides, evidenciando o núcleo e os prolongamentos citoplasmáticos. (C) Menor aumento de cultura em quarta passagem, mostrando confluência celular acima de 80%. Barra = 100µm.....pág. 31

Figura 2. Gráfico com as médias de marcação dos anticorpos CD11, CD34, CD45, MHCII, CD73 e CD90, das células tronco mesenquimais utilizadas, pré congelamento, e após descongelamento com 30, 60 e 90 dias de conservação.....pág. 32

Figura 3. Fotomicroscopia das células, antes e após diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. (A), (B), (C), (D), (E) células tronco indiferenciadas, (F) células submetidas a diferenciação osteogênica, (G) células submetidas à diferenciação condrogênica, (H) células submetidas à diferenciação adipogênica.....pág. 33

Figura 4. Gráfico da avaliação motora dos animais submetidos ou não ao trauma medular, tratados ou não, em quatro avaliações (Avaliações: 1=24 horas antes do procedimento, 2=24 horas depois, 3=7 dias depois e 4=15 dias depois; Grupos: CN=controle negativo, CP=controle positivo, CDT=condroitinase, CTM=células tronco mesenquimais, CDT+CTM= condroitinase e células tronco).....pág. 34

Figura 5. Gráfico da expressão gênica de vimentina dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).....pág. 35

Figura 6. Gráfico da expressão gênica de VEGF dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).....pág. 36

Figura 7. Gráfico da expressão gênica de TGF-β dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).....pág. 36

Figura 8. Gráfico da expressão gênica de PECAM-1 dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).....pág. 37

Figura 9. Gráfico da expressão gênica de BDNF dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).....pág. 37

Resumo

O trauma medular agudo é frequente na rotina da clínica veterinária, e por vezes determina a eutanásia do paciente, ou prejuízos importantes à qualidade de vida do mesmo, como a perda de função motora. A cicatriz glial é considerada barreira determinante à regeneração espinal, e é constituída a partir da produção de proteoglicanas de sulfato de condroitina por astrócitos reativos. No presente estudo, 25 ratos foram submetidos ao trauma espinal agudo compressivo, e posteriormente tratados com a enzima bacteriana condroitinase ABC por via intramedular, imediatamente após o trauma, e células tronco mesenquimais de tecido adiposo por via intravenosa, três horas depois. Os grupos que receberam condroitinase, associada ou não às células tronco, apresentaram melhor recuperação motora em relação aos que não foram tratados com a enzima. Esses animais também tiveram aumento na expressão gênica relativa, avaliada por PT-PCR em tempo real, de BDNF e PECAM-1 em relação ao grupo controle. A expressão de vimentina também foi avaliada, e os grupos tratados com condroitinase isoladamente e associada às células tronco, assim como o grupo tratado com células tronco isoladamente, tiveram menor expressão em relação ao grupo controle. Sugere-se então que a condroitinase por via intramedular, aplicada imediatamente após o trauma, é capaz de promover recuperação funcional precoce e induzir a produção de fatores neuroprotetores. Além disso, a enzima e as células tronco, modulam a astrogliose, reduzindo a expressão de vimentina, um componente dos filamentos intermediários, presentes na cicatriz glial.

Abstract

Acute spinal cord trauma is frequent in veterinary clinical routine, and sometimes determines the patient euthanasia, or serious damage to the life's quality, as the loss of motor function. Glial scar is considered a barrier to the spinal cord regeneration, and it is constituted by chondroitin sulfate proteoglycan production by reactive astrocytes. On this study 25 rats were submitted to the compressive spinal cord trauma, and lately treated with chondroitinase ABC intramedullary immediately after trauma, and mesenchymal stem cells from adipose tissue intravenously threehours later. The groups that received chondroitinase, associated or not to stem cells, presented better motor recovery than those that were not treated with the enzyme. These animals also had increase in the relative gene expression, evaluated by real-time PCR of BDNF and PECAM-1 in relation to the control group. The expression of vimentin was also evaluated, and chondroitinase alone and stem cell associated groups, as well as the stem cell group, had lower expression when compared with the control group, suggesting that chondroitinase intramedullary, applied immediately after the trauma, is capable of promoting early functional recovery and inducing the production of neuroprotective factors. In addition, the enzyme and stem cells modulate astrogliosis, reducing the expression of vimentin, a component of the intermediate filaments present in the glial scar.

1. Introdução

O trauma medular agudo representa uma das entidades mais freqüentes e graves na clínica veterinária de pequenos animais (Arias *et al.* 2007) e o tratamento para tal injúria deve ser instituído o quanto antes, pois o trauma inicial deflagra uma série de

alterações secundárias, por vezes responsáveis pela impossibilidade do retorno de funções motoras e sensoriais do paciente (Braund, 2003).

Pessoas acometidas pelo traumatismo espinhal agudo ainda têm prognóstico desfavorável, o que impulsiona pesquisas a cerca da fisiopatogenia desta entidade e seu tratamento (Jeffery e Blakemore, 1999). Estima-se que, aproximadamente, 2,5 milhões de pessoas sofram com o traumatismo medular agudo, sendo 130.000 novos casos ao ano (Adams e Cavanagh, 2014, citado por Oliveri *et al*, 2014). Várias estratégias têm sido estudadas em modelos animais, uma vez que não há cura para tal enfermidade (Kundi *et al*, 2013a). O conhecimento adquirido a esse respeito em pequenos animais pode incrementar as opções terapêuticas e o sucesso obtido também na medicina humana (Jeffery e Blakemore, 1999).

Após a injúria medular, se inicia o processo de formação da cicatriz glial (Rhodes *et al*, 2003), no qual astrócitos reativos produzem filamentos intermediários, e estes, proteoglicanas de sulfato de condroitina-PGSC (Schachtrup *et al*, 2010), considerados principais inibidores da regeneração do sistema nervoso (Silver e Miller, 2004, Tom *et al*, 2004). Em estudos anteriores, a enzima bacteriana condroitinase ABC promoveu a recuperação após injúria medular por destruir as PGSC (Crespo *et al*, 2007). Demonstrou-se também que o uso desta enzima aumenta a plasticidade axonal (Tom e Houlé, 2008), promove a regeneração neuronal (Tom *et al*, 2009; Lin *et al*, 2011), e a recuperação sensorial (Shields *et al*, 2008). Assim, a manipulação da cicatriz glial, pelo uso da condroitinase, parece ser terapia promissora para o traumatismo medular (Crespo *et al*, 2007).

Entretanto, a combinação de estratégias terapêuticas na injúria medular teria maior sucesso frente a complexidade desta entidade (Cregg *et al*, 2014). Assim, propõe-se no presente estudo, a utilização da enzima condroitinase, associada a terapia com células tronco mesenquimais (CTM). Inicialmente, o interesse a cerca desta terapia se deu devido à indiferenciação apresentada pelas células tronco, e sua capacidade em transdiferenciar em células de diferentes tecidos, inclusive neurais (Ucceli *et al*, 2006). Entretanto, atualmente já se sabe que as CTMs secretam diversos fatores de crescimento e citocinas que auxiliam na regeneração tecidual (Drago *et al*, 2013), e em recentes estudos

demonstrou-se que as CTMs modificam o microambiente lesado e promovem a sobrevivência de células, como neurônios e oligodendrócitos (Cho *et al*, 2009). Existem também outros benefícios da terapia celular em injúrias do sistema nervoso central (SNC), como regeneração axonal das células lesadas (Honmou *et al*, 2012; Liu *et al*, 2013; Spejo *et al*, 2013), imunomodulação (Ucceli *et al*, 2011) com redução da astrogliose (Boido *et al*, 2012), estabilização sináptica (Spejo *et al*, 2013), recuperação funcional (Osaka *et al*, 2010) e neovascularização (Honmou *et al*, 2012).

2. Hipóteses

2.1 Hipótese Geral

Células tronco de tecido adiposo associadas à enzima bacteriana condroitinase ABC promovem regeneração axonal previnem a formação da cicatriz glial em medula espinhal de ratos com trauma agudo.

2.2 Hipóteses Particulares

1. A aplicação precoce de condroitinase ABC no trauma da medula espinhal, previne a formação da cicatriz glial, por digerir as proteoglicanas de sulfato de condroitina, permitindo maior atividade benéfica das células tronco.
2. As células tronco de tecido adiposo têm efeito imunomodulador, reduzindo a astrogliose, e portanto, a indução da formação da cicatriz glial.
3. Há efeito sinérgico na administração de condroitinase e células tronco mesenquimais em relação a liberação de fatores favoráveis à regeneração e neovascularização da medula espinhal.
4. Os tratamentos, isoladamente ou em associação, promovem a recuperação da função motora precocemente.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estudar a ação da condroitinase ABC e das células tronco mesenquimais de tecido adiposo, em associação ou não, no traumatismo medular experimental em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a recuperação de função motora de ratos submetidos ao trauma medular, por meio de teste clínico, submetidos ou não aos tratamentos propostos.
2. Avaliar a expressão gênica do filamento intermediário vimentina, do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), da molécula de adesão endotélio plaquetária (PECAM-1), do fator transformador de crescimento (TGF- β) e do fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF), nos animais submetidos ao trauma medular, tratados ou não.
3. Avaliar a viabilidade da aplicação de condroitinase intramedular por meio de teste clínico em relação à função motora.

4. Revisão de Literatura

4.1 Fisiopatogenia do trauma medular agudo

A injúria medular é definida como a ocorrência de lesão aos elementos neuronais que resulta em déficit temporário ou permanente, sensorial e/ou motor (Tohda e Kuboyama, 2011). O trauma medular agudo resulta em lesões classificadas em dois grupos: lesões primárias e secundárias à medula espinhal. As lesões primárias são decorrentes dos efeitos imediatos e mecânicos resultantes do traumatismo (Bergman *et al*, 2000), levando a destruição de elementos neuronais e vasculares (Braund, 1993) que resulta em interrupção de impulsos nervosos (Liu *et al*, 1997; Bagley *et al.*, 1999). As lesões secundárias determinam a perda de tecido neuronal inicialmente não lesado (Bergman *et al*, 2000).

Dentre as lesões secundárias, demonstrou-se que a isquemia é importante responsável pela gravidade da injúria a medula espinhal, causando inclusive efeitos sistêmicos, como hipotensão e redução do débito cardíaco (Tator; Fehlings, 1991). O deficiente suprimento de glicose e oxigênio induzem o metabolismo anaeróbio, que produz quantidade insuficiente de adenosina trifosfato (ATP) para o funcionamento de bombas de sódio dependentes de ATP, presentes nas membranas celulares, o que determina perda da homeostase celular e influxo de sódio (Janssens, 1991). As lesões neuronais associadas à redução do suprimento energético, também causam aumento da liberação celular de glutamato, um neurotransmissor excitatório que, em

contato com seu receptor, promove a abertura dos canais de íons da membrana celular. Com os canais iônicos abertos tem-se influxo de cálcio e, em menor quantidade, de sódio e cloreto, o que promove o edema e, portanto, a própria isquemia (Braund, 1993; Jeffery, 1999). O aumento de cálcio intracelular ativa o mecanismo da caspase 3, que desencadeia a sinalização celular a apoptose. Tal evento também ativa a fosfolipase A₂, que cliva o ácido aracdônico, iniciando a cascata inflamatória e a liberação de prostaglandinas e leucotrienos, o que aumenta a permeabilidade vascular (Janssens *et al*, 1991). O metabolismo do ácido aracdônico também intensifica a agregação plaquetária por liberação de tromboxano, ocasionando a obstrução de vasos sanguíneos (Braund, 1993; Bartholdi e Schwab, 1997). Também por depleção da produção de ATP, ocorre a liberação de radicais livres de oxigênio que, por peroxidação lipídica, determinam lesão à membrana celular e mais prejuízo a homeostase celular (Basu *et al*, 2001).

Para remoção de restos celulares resultantes da apoptose, macrófagos e fibroblastos são recrutados para o local, e a lesão medular já apresenta hemorragia, cavitações, edema e gliose (Tator e Fehlings, 1991). A formação de cistos medulares intensifica as disfunções motora e sensorial (Grill *et al*, 2005).

4.2 Formação da cicatriz glial e o uso da enzima condroitinase

Frente à injúria medular, a cicatriz glial é formada a partir de astrócitos reativos e hipertrofiados, que expressam filamentos intermediários, cujos principais componentes são a proteína ácida fibrilar (GFAP) e a vimentina, fenômeno chamado de gliose reativa ou astrogliose (Silver e Miller, 2004, Machado *et al*, 2006; Tom e Houlé, 2008). Este é um evento complexo e multifatorial que, num primeiro momento, minimiza os danos teciduais por restringir a lesão, produzir fatores de crescimento, promover a revascularização, a manutenção da homeostase e a retirada de debris celulares. Entretanto, seus efeitos prejudiciais à regeneração parecem se sobrepor aos efeitos benéficos (Karimi-Abdolrezaee e Billakanti, 2012). Estes filamentos (GFAP e vimentina) produzem as proteoglicanas de sulfato de condroitina (PGSC), que reduzem o brotamento axonal, sendo considerados

inibidores da regeneração do sistema nervoso (Silver e Miller, 2004, Tom *et al*, 2004). Notou-se também que os axônios tornam-se tortuosos nas proximidades da cicatriz glial, e poucos conseguem penetrá-la (Rhodes *et al*, 2003).

Proteoglicanas (PGs) são proteínas com uma ou mais ligações a glicosaminoglicanas (GAG), e são um importante componente da matriz extracelular (Sugahara *et al*, 2003). O sulfato de condroitina é formado a partir da polimerização de repetidas unidades de dissacarídeos de ácido glucorônico e N-acetil-galactosamina, com o radical sulfato, que pode estar em diferentes posições. O sulfato de condroitina ligado à PGs, constitui a PGSC, uma barreira a regeneração axonal (Sugahara e Kitagawa, 2000).

A quebra da barreira hemato espinhal, e a presença de fatores sanguíneos na medula espinhal, também têm importante participação na formação da cicatriz glial (Cregg *et al*, 2014). Sugere-se que o fibrinogênio, por meio de sinalização mediada pelo TGF- β , induza a produção de PGSC pelos astrócitos (Schachtrup *et al*, 2010). O fator transformador de crescimento beta (TGF- β) tem sido estudado devido ao seu efeito ativador da astrogliose (Asher *et al*, 2000; Lagord *et al*, 2002; Machado *et al*, 2006; Kimura-Kuroda *et al*, 2010; Schachtrup *et al*, 2010). Após a injúria, o TGF- β é sintetizado pela micróglia, e em menores quantidades, pelos astrócitos (Machado *et al*, 2006). Hsiao e seus colaboradores (2013) inibiram receptores de TGF- β , em cultura de astrócitos com emprego de fibrinogênio, o que reduziu a expressão de PGSC, apesar de não tê-la cessado.

Frente a esse quadro, inicia-se o processo de reparação, sendo a angiogênese um de seus principais mecanismos (Kundi *et al*, 2013b). O fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), descoberto em células tumorais (Senger *et al*, 1983) é um dos principais sinalizadores da angiogênese. Regulado na hipóxia pela ação do fator induzido por hipóxia (HIF), o VEGF estimula a morfogênese do vaso sanguíneo (Kundi *et al*, 2013b), tem efeito neuroprotetor (Jin *et al*, 2000; Sun *et al*, 2003), promove o crescimento axonal e da suporte à sobrevivência e proliferação de células gliais (Jin *et al*, 2002).

Estudos estabeleceram que a enzima bacteriana condroitinase ABC promove recuperação funcional na injúria ao sistema nervoso (Crespo *et al*, 2007), pois fragmenta as GAGs do núcleo protéico da PGSC (Iseda *et al*, 2008; Shield *et al*, 2008). Demonstrou-se também que o uso desta enzima aumenta a plasticidade axonal (Tom e Houlé, 2008), promove a regeneração neuronal (Tom *et al*, 2009; Lin *et al*, 2011), e a recuperação sensorial (Shield *et al*, 2008). A degradação das PGSCs forma o 6-sulfato dissacarídeo, que estimula a liberação de fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF), promovendo a regeneração e recuperação funcional do sistema nervoso central (Lin *et al*, 2011), por dar suporte à sobrevivência de neurônios sensoriais (Hyman *et al*, 1991). Assim, o uso da condroitinase em pacientes acometidos por injúria medular, visando a desestruturação da matriz extracelular, e portanto, manipulação da cicatriz glial, representa uma terapia potencial e promissora (Crespo *et al*, 2007).

4.3 Células tronco mesenquimais e seu uso na neurologia

As células tronco têm grande potencial para várias aplicações terapêuticas, principalmente por sua característica de indiferenciação (Bydlowski *et al*, 2009), sendo capazes de se autorrenovar e se diferenciar em diversos tipos celulares. Além disso, apresentam propriedades imunomoduladoras e efeito parácrino mediante injúria tecidual (Zuttion *et al*, 2013), fato importante já que as alterações do microambiente resultantes da injúria medular constituem importante fator limitante à regeneração tecidual (Counmans *et al*, 2001).

O primeiro registro do isolamento de células tronco data de 1970, quando Friendstein e seus colaboradores descrevem uma cultura celular de medula óssea de cobaias, que apresentou desenvolvimento de fibroblastos e formação óssea espontânea. Em 1991, Caplan propõe a nomenclatura para designá-las: Células Tronco Mesenquimais (CTM)-Mesenchimal Stem Cell.

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy), para que se caracterize uma célula tronco a mesma deve:

- Apresentar aderência ao plástico quando em cultura celular;

- A maior parte das células da cultura deve ser positiva para CD105, CD73 e CD 90, e negativa para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR (MHC).

- Ter capacidade de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Dominici *et al*, 2006).

As CTMs podem ser isoladas a partir de diversos tecidos, como sangue de cordão umbilical, líquido amniótico, medula óssea, derme, fígado, baço, polpa dentária e tecido adiposo (Zuttion *et al*, 2013). O primeiro sítio amplamente estudado de coleta de CTM foi a medula óssea, entretanto, o isolamento destas a partir de tecido adiposo parece mais promissor. Sua obtenção pode ser feita com anestesia local, com mínimo desconforto, e grande quantidade de material (Zuk *et al*, 2001). Além disso, o rendimento de CTM de tecido adiposo é 40 vezes maior que de medula óssea (Kern *et al*, 2006).

Por se acumularem próximas aos processos inflamatórios (Souza *et al*, 2010) devido a atração para tecidos com injúria (Sykova e Jendelová, 2007), as CTM não precisam ser aplicadas no local da lesão, podendo ser administradas por via endovenosa (Osaka *et al*, 2010; Honmou *et al*, 2012; Silva, 2013).

Inicialmente, o interesse pela terapia celular na neurologia se deu a partir da expectativa de regeneração tecidual, devido a capacidade de diferenciação das CTM em células neuronais (Ucceli *et al*, 2011). A neurogênese em pacientes tratados com CTM se dá por três mecanismos: transdiferenciação celular, fusão celular e atividade parácrina (Maltman *et al*, 2011). Porém, a maior parte dos estudos, que obtiveram sucesso com o uso de CTM *in vivo* no trauma medular, observaram que a diferenciação ou mesmo integração das células transplantadas não foram os principais responsáveis pela recuperação funcional do sistema nervoso, mas sim o efeito transformador do microambiente lesado (Ankey *et al*, 2004; Rooney *et al*, 2009). Assim, atualmente cresce o interesse na secreção de citocinas e fatores de crescimento dessas células (Drago *et al*, 2013), que modificam o microambiente e promovem a sobrevivência de células, como neurônios e oligodendrócitos (Cho *et al*, 2009). Estudos já determinaram também outros benefícios da terapia celular em injúrias do sistema nervoso

central (SNC), como regeneração axonal (Honmou *et al*, 2012; Liu *et al*, 2013; Spejo *et al*, 2013), imunomodulação (Ucceli *et al*, 2011) com redução da astrogliose (Boido *et al*, 2012), estabilização sináptica (Spejo *et al*, 2013) e recuperação funcional (Osaka *et al*, 2010).

Conclui-se então o grande potencial terapêutico das CTM às injúrias do SNC (Boido *et al*, 2012) e, frente à complexidade do traumatismo medular, faz-se necessária a combinação de diferentes estratégias para que se obtenha ótima recuperação nesses casos (Busch e Silver 2007).

5. Materiais e Métodos

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado sob o protocolo de número 145/11.

5.1 Coleta de Tecido Adiposo, Isolamento e Cultivo de CTM

Dez ratos da linhagem Lewis, machos, transgênicos homozigóticos para proteína verde fluorescente – GFP (LEW-TgeGFP F455/Rrrc), de quatro semanas de vida, massa corporal média de 200g, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICB-UFMG, foram utilizados para colheita de tecido adiposo e obtenção de células-tronco mesenquimais (CTM).

Os animais foram submetidos a eutanásia com aplicação intraperitoneal de sobredose de tiopental sódico (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil, na dose de 180 mg/kg) e punção sanguínea intracardíaca, e posteriormente foi realizada a tricotomia e antisepsia 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 salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,2 e transferidos para frascos de 50,0 mL (Falcon 50 - Sarsted®) contendo o meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - Sigma®) sem soro fetal bovino (SFB - Gibco®). 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 20,0 mL de solução e 30 gramas de tecido foram adicionados 10,0 mL de solução de colagenase 0,15% dissolvida em PBS 0,15M para digestão enzimática. Os frascos foram incubados 60 min. a 37° C e agitados a cada 15 min. Transcorrido o tempo, foram adicionados em cada frasco 20,0 mL de DMEM com 10% de SFB para inativação da enzima. O conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e 23°C. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* contendo as células foi ressuscitado em 5,0 mL de DMEM com 10% de SFB, e plaqueado em garrafas de 75 cm² (Sarsted®).

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 50,0 mL. 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 garrafas de 25cm². As garrafas que tiveram o meio removido receberam 5,0 mL do meio DMEM com 10% de SFB e retornaram a estufa.

As garrafas 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 5,0 mL de PBS 0,15M. Posteriormente adicionou-se 750,0 µL de solução de tripsina (tripsina 0,05% e 0,53mM EDTA - Gibco®) 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 foram adicionados 1,0 mL de meio DMEM com 10% de SFB para inativar a tripsina.

O conteúdo das garrafas foram transferidos para tubos de 50,0 mL e centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm e 23°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuscitado em 1,0 mL de meio DMEM com 10% de SFB. Uma alíquota de 2,0 µL da solução contendo as células foi adicionada a 98,0 µL de solução de Turkey

homogeneizada e transferida para câmara de Newbauer para contagem da concentração celular. Foram replaqueados em cada passagem $2,0 \times 10^4$ células por garrafa. 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 congeladas para confecção de um banco de células para os tratamentos.

Para congelamento, as CTM foram desprendidas da garrafa com uso de tripsina e centrifugadas. Após ressuspensão em PBS foram contadas em câmara de Neubauer para obtenção de 1×10^6 células por dose. Nos tubos com as células foi acrescido meio de congelamento, constituído por DMEN (50%), SFB (40%) e DMSO (10%). Os tubos, em isopor foram colocados em freezer a -80° , possibilitando a troca de temperatura de forma lenta. Após 24 horas, foram transferidos para nitrogênio líquido (-196°) para conservação e posterior transplante.

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).

Todas as etapas de caracterização das CTM foram realizados antes do congelamento e após os descongelamentos para utilização das células.

5.2 Caracterização das CTM por Citometria de Fluxo

As CTM da quarta passagem e as células descongeladas, foram submetidas à imunofenotipagem utilizando-se os anticorpos anti-CD45 (clone 69 mouse - BD Bioscience, San Jose, Califórnia, EUA), anti-CD90 (clone Ox-7 mouse - AbCam, Cambridge, Massachusetts, EUA), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse - AbCam), anti-CD 34 (Santa Cruz Biotechnology) e anti-MHC II (AbCam). 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 Newbauer e divididas em 27 *ependorffs* identificados com os anticorpos testados, o controle da reação (branco) e o controle do anticorpo secundário. As células foram duas vezes lavadas com 1,0 mL de PBS e centrifugadas durante 7 min. à 1400rpm e 23°C . Posteriormente cada amostra foi incubada por 30 min. a 4°C com solução de PBS contendo o anticorpo primário. Seguiu-se a centrifugação dos *ependorffs*, descarte do

sobrenadante, duas lavagens com solução de PBS e a incubação com o anticorpo secundário Alexa 555 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.

A avaliação foi realizada no citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®, com um mínimo de 30.000 eventos por amostra testada. Cada leitura foi realizada em triplicata.

5.3 Diferenciação das CTM *in vitro*

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

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços (TPP®) 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-glicerofosfato, 0,01 g de vitamina C e 2,17 μ L de dexametasona 0,4%. 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%, 400,0 μ L de insulina, 200,0 μ M de indometacina cristalina (SIGMA®) e 500,0 μ M de isobutilmetilxantina (SIGMA®) ao meio DMEM sem SFB. A diferenciação adipogênica foi mantida por 21 dias e identificadas por coloração com OilRed O após fixação das células como descrito anteriormente.

A diferenciação condrogênica foi realizada em *pellet* celular, diferentemente das diferenciações osteogênica e adipogênica. Os *pellets* celulares foram obtidos após centrifugação de $1,0 \times 10^6$ células em tubos de 15,0 mL. 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 1,0 mM, 200,0 µL de insulina, 6,5 µL de transferrina, 5mg de vitamina C, 0,125mg de BSA, 10,0 µL de dexametasona 0,4% e 1,0 µL de TGF-beta (SIGMA®), sendo o último adicionado no momento da troca do meio. O meio foi trocado uma vez por semana até o 21º dia, momento em que os pellets celulares foram fixados com paraformaldeído 4% tamponado e submetidos ao processamento rotineiro para obtenção de cortes em paraplast. As lâminas foram coradas com Alcian Blue para identificação da diferenciação condrogênica.

5.4 Aplicação de Condroitinase e células tronco mesenquimais

4.4.1 Estudo *in vivo*

Vinte e cinco ratos Wistar, machos, de 36 semanas de idade, pesando entre 300 e 350g provenientes do Biotério Central da UFMG foram utilizados para a seguinte etapa. Previamente ao período experimental os animais passaram por 30 dias de adaptação ao Centro Experimental de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da 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 roedores da Purina® e receberam água *ad libitum*.

5.4.2 Grupos Experimentais

Grupo CN- Controle Negativo (N=5) - Os animais foram submetidos à laminectomia para exposição da medula espinhal, mas não sofreram trauma medular. Neste momento receberam PBS intramedular. Após 3 horas do procedimento cirúrgico foi aplicado PBS por via intravenosa.

Grupo CP- Controle Positivo (N=5) - Os animais foram submetidos à laminectomia e traumatismo medular compressivo. Em seguida foi aplicado PBS intramedular, e após 3 horas do traumatismo, foi aplicado PBS por via intravenosa.

Grupo CDT- Tratamento com condroitinase (N=5) - Os animais foram submetidos à laminectomia e traumatismo medular compressivo. Em

seguida foi aplicada condroitinase intramedular, e após 3 horas do traumatismo, foi aplicado PBS por via intravenosa.

Grupo CTM - Tratamento com células tronco mesenquimais (N=5) - Os animais foram submetidos à laminectomia e traumatismo medular compressivo. Em seguida foi aplicado PBS intramedular, e após 3 horas do traumatismo, CTM via por intravenosa.

Grupo CDT+CTM - Tratamento com condroitinase associada a células tronco mesenquimais (N=5) - Os animais foram submetidos à laminectomia e traumatismo medular compressivo. Em seguida foi aplicada condroitinase intramedular, e após 3 horas do traumatismo, CTM por via intravenosa.

5.6 Protocolos Anestésico e Cirúrgico, aplicação de Condroitinase ou PBS intramedular

A indução e manutenção anestésicas foram realizadas com isoflurano (Isoflurane- Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil), a 4 e 2% respectivamente, por meio de máscaras faciais em sistema semiaberto. Com os animais anestesiados, foi realizada tricotomia da região dorsal e aplicação de antibiótico profilático (cefalotina sódica- Ariston Indústrias Farmacêuticas LTDA, São Paulo, SP, Brasil- na dose de 60 mg/Kg) e medicação analgésica (morfina- Dimorf, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil- na dose de 5mg/Kg), ambos por via subcutânea.

Os ratos foram posicionados em decúbito esternal em placa de polietileno com aquecimento. Após incisão de pele e tecido subcutâneo em linha média dorsal, os músculos epaxiais foram afastados para exposição dos processos espinhosos das 11^a vértebra torácica (T11) a 13^a (T13). Foi então realizada ostectomia do processo espinhoso de T12, e com uso de *drill* pneumático neurológico (ECCOS[®] Aesculap, Laboratório B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), foi retirada a lâmina vertebral. Após exposição da medula espinhal, os animais dos grupos com traumatismo medular, foram submetidos à compressão medular, com uso de aparelho estereotáxico, desenvolvido na Escola de Veterinária da UFMG (Torres *et al*, 2010). A haste do aparelho foi colocada sobre a duramáter, e assim permaneceu por 5 minutos,

exercendo sobre a medula pressão de 70g, determinando trauma compressivo.

A seguir, com uso de micro bomba de infusão acoplada a seringa de Hamilton, foram aplicados 4µL de condroitinase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, 10U/mL), no animais dos grupos CDT e CDT+CTM, e 4,0 µL de PBS, nos animais dos grupos CP e CTM, na velocidade de 0,8 µL/min. Após a aplicação, a agulha permaneceu no local por mais um minuto, para evitar refluxo do conteúdo injetado.

Realizou-se então, aproximação muscular, com sutura em padrão simples separado, e redução de espaço morto com sutura em reverdin e fio polipropileno 4-0. A dermorráfia foi feita com pontos simples separados e fio mononylon 3-0.

Para recuperação anestésica, os animais foram mantidos em caixas aquecidas e receberam oxigênio por máscara facial. No período pós operatório, durante cinco dias, foi administrada, por via subcutânea medicação analgésica, sendo nos três primeiros dias feita morfina (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil, na dose de 5mg/Kg a cada quatro horas) e posteriormente cloridrato de tramadol (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil, na dose de 4 mg/Kg, a cada oito horas). Também foi realizada massagem vesical em todos os animais, a cada oito horas, durante sete dias, sendo que após esse período, todos recuperaram capacidade para micção espontânea. Os pontos de pele foram retirados sete dias após o procedimento.

5.7 Aplicação de CTM ou PBS Intravenosa

Após o descongelamento, e antes da inoculação nos animais, as células foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de tripan. Após suspensão com tripsina e adição de DMEM com 10% de soro fetal bovino, as células foram colhidas, centrifugadas e, o *pellet* contendo as células suspenso novamente em 2,0 mL de DMEM. Retirou-se 2,0 µL dessa suspensão e adicionou-se a 49,0 µL de PBS e 49,0 µL de azul de tripan e, na câmara de Neubauer foi determinado o número total de células e o número de células viáveis. Esse número de células viáveis foi utilizado para determinar o volume de tampão fosfato salino (PBS) estéril a ser adicionado ao *pellet* de células para uma concentração final de 5×10^6 células/mL, utilizada para o transplante celular. Antes de serem colocadas nessa concentração final, as células

foram lavadas três vezes com PBS para retirada de resquícios de soro fetal bovino que poderia causar reação de rejeição nos animais.

Três horas após o traumatismo, os animais foram contidos manualmente, e após antissepsia, foi realizada cateterização da veia caudal. Os animais dos grupos CP, CN e CDT, receberam 0,5 ml de PBS, e aqueles dos grupos CTM e CDT+CTM, 0,5 ml de solução de PBS com aproximadamente 1×10^6 CTM.

5.8 Avaliação da Função Motora

Foi utilizada a escala de escore motor, proposta por Basso, Beattie e Bresnahan - BBB- (Basso *et al*, 1995) para avaliação da função motora dos animais, por meio da tabela a seguir:

Tabela 1: Escala de escore para capacidade motora, proposta por Basso, Beattie e Bresnahan em 1995.

Escore	Capacidade Motora
0	Nenhum movimento observável nos membros posteriores
1	Movimento discreto de uma ou duas articulações, normalmente o quadril (coxofemoral) ou joelho (femerotibiopatelar)
2	Movimento extenso de uma articulação ou Movimento extenso de uma articulação e discreto de outra
3	Movimento extenso de duas articulações
4	Movimento discreto das três articulações do membro posterior
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira
7	Movimento extenso das três articulações do membro posterior
8	Andar tocando no chão mas sem apoio do peso ou Posição plantar do membro sem apoio do peso
9	Posição plantar do membro com apoio do peso quando parado ou Apoio de peso ocasional, freqüente ou consistente na passada dorsal e sem passada plantar
10	Suporte de peso ocasional na passada plantar, sem coordenação dos membros torácicos e pélvicos
11	Apoio do peso freqüente a consistente na passada plantar sem coordenação dos membros torácicos com os pélvicos
12	Apoio do peso freqüente a consistente na passada plantar com ocasional coordenação dos membros torácicos e pélvicos
13	Apoio do peso freqüente a consistente na passada plantar com

freqüente coordenação dos membros torácicos e pélvicos

- 14** Consistente apoio de peso na passada plantar, consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos, e a posição predominante do membro quando em locomoção é rotacionado (externa ou internamente) quando faz contato inicial com a superfície, bem como imediatamente antes de ser levantado no final da postura; ou
Passada freqüentemente plantar com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos e passadas dorsais ocasionais
- 15** Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos, sem levantar dos dedos dos pés; ou ocasional levantar dos dedos do pé ao avançar do membro, a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial
- 16** Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante a marcha, e o levantar dos dedos dos pés ocorre freqüentemente durante o avançar do membro para frente; a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial e rotacionada ao final do movimento
- 17** Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante a marcha, e o levantar dos dedos dos pés ocorre freqüentemente durante o avançar do membro para frente; a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial e final do movimento
- 18** Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante a marcha, o levantar dos dedos dos pés ocorre consistentemente durante o avançar do membro para frente; a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial e rotacionada ao final do movimento
- 19** Passada plantar consistente com consistente coordenação dos membros torácicos e pélvicos durante a marcha, o levantar dos dedos dos pés ocorre consistentemente durante o avançar do membro para frente; a posição predominante do membro é paralela ao corpo ao contato inicial e ao final do movimento; e a cauda está abaixada em parte ou todo o tempo
- 20** Passada plantar e marcha coordenada consistentes, levantar dos dedos dos pés consistente, posição predominante do membro é
-

paralela ao corpo ao contato inicial e ao final do movimento; cauda consistentemente para cima e instabilidade do tronco

21 Passada plantar e marcha coordenada consistentes, levantar dos dedos dos pés consistente, a posição predominante do membro é paralela o movimento todo, consistente estabilidade do tronco, cauda constantemente levantada

Tal avaliação foi feita em todos os animais, 24 horas antes do procedimento cirúrgico, 24 horas após o trauma e depois de sete e 15 dias. Para tanto, os animais foram colocados em campo aberto de 1,0 m², e filmados durante dois minutos. Dois avaliadores, que desconheciam o grupo a que cada animal pertencia, assistiram os vídeos e classificaram os animais em escores de zero a 21, conforme a escala. Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram colocados no mesmo campo, em dias alternados, durante uma semana, para que se acostumassem ao espaço.

5.9 Eutanásia

No 15º dia, após o procedimento cirúrgico, foi realizada eutanásia dos animais com sobredose de tiopental sódico (180mg/Kg), por via intraperitoneal e punção sanguínea por via intracardíaca. Um segmento da medula de 1,0 cm a partir do centro da lesão cranial e caudal, foi dissecado de forma asséptica, e colocada em criotubo, contendo 1,5 ml de Trizol. Estes foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido, e a seguir, mantidos em freezer a -80°C.

Foi realizada necropsia de todos os animais, e avaliação macroscópica dos órgãos das cavidades abdominal e torácica.

5.10 Avaliação da expressão gênica relativa do Vimentina ,VEGF, PECAN-1, TGF- β e BDNF por PT-PCR em tempo real

O fragmento coletado da medula de cada animal, foi submetido a técnica de reação em cadeia da polimerase (PT-PCR) em tempo real. Utilizou-se a expressão do gene normalizador GAPDH, do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), molécula de adesão celular endotélio plaquetária (PECAN-1), vimentina, fator neurotrófico derivado de encéfalo (BDNF) e fator transformador de crescimento (TGF- β). As seqüências de nucleotídeos de cada primer iniciador, *Forward* (F) e *Reverse* (R) estão especificadas na tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2. Seqüência de nucleotídeos dos primers iniciadores utilizados para PT-PCR em tempo real.

Primer	Seqüência de nucleotídeos	
GAPDH	F	TGCACCACCAACTGCTTA
	R	GGATGCAGGGATGATGTTC
VIMENTINA	F	CTGCTGGAAGGGGAGGAGAG
	R	GGTCATCGTGGTGCTGAGAAG
VEGF	F	GAAGGTTTCTGAGCCCAGTG
	R	AAATCCTGGAGCGTTCACTGTG
TGF-β	F	GAAACGGAAGCGCATCGA
	R	TGGCGAGCCTTAGTTTGGA
PECAM-1	F	GAAGGTTTCTGAGCCCAGTG
	R	TCAAGGGAGGACACTTCCAC
BDNF	F	CACAATGTTCCACCAGGTG
	R	TGGGCGCAGCCTTCAT

Para extração de RNA, cada fragmento medular foi macerado com uso de pistilos plásticos, livres de DNase e RNase, em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de trizol, e deixados por cinco minutos no gelo. 0,2 ml de clorofórmio foram adicionados a cada tubo, e estes agitados por 15 segundos. Após centrifugação a 11.400 rpm, 4°C, por 15 minutos, formaram-se três fases em cada tubo, sendo que a superior, transparente, continha o RNA. Esta foi pipetada e transferida a outro tubo ao qual se acrescentou 0,5 ml de álcool isopropílico. Os tubos foram congelados a -80°C, e descongelados, quando notou-se a formação de um *pellet*, contendo RNA. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e este, centrifugado a 11.400 rpm, a 4°C, por 10 minutos, notando-se formação de *pellet* de RNA. O sobrenadante foi descartado, e os dois tubos de cada amostra, receberam 1,0 ml de etanol 75% seguido de centrifugação e descarte do etanol. Após secagem do RNA, realizou-se homogeneização com adição de 20,0 μ L de água ultrapura, e as amostras foram incubadas a 55°C, por 10 minutos. O RNA foi quantificado em cada amostra, diluindo 2,0 μ L do RNA extraído em 98,0 μ L de água ultrapura. A mensuração foi feita em aparelho espectrofotômetro de luz UV, por avaliação das absorbâncias a 260nm e relação entre absorbâncias 260/280nm. As amostras foram congeladas a -80°C, para posterior confecção de DNA complementar (cDNA).

Para confecção de cDNA foi utilizado kit comercial (Super Script III Platinum Two Step qRT-PCR Kit With Syber Green- Invitrogen), de acordo com as instruções do

fabricante. A partir da mensuração de pureza de cada amostra, calculou-se a quantidade de reagente para 1,0 µg de RNA. Foi feita solução contendo RT e 2xRT (transcriptase reversa) do kit. A cada amostra de RNA foram adicionadas essa solução e água ultrapura. No termociclador, os tubos foram incubados a 25°C durante 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 85°C durante 5 minutos. E após a adição de 1,0 µL de RNase H, a 37°C durante 20 minutos, e congeladas a -20°C para posterior realização do PCR em tempo real.

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

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

5.11 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos dados das expressões gênicas, e então submeteu-se a análise de variância (ANOVA), e ao teste de Student-Newman-Keuls. Os escores do teste de função motora foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas entre pares de tratamento pelo teste de Dunn.

Para análise estatística foi utilizado os programas *Prism 5 for Windows, version 5.01 e GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA*, com nível de significância de 5%.

6. Resultados

6.1 Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais

Em cultivo, as células apresentaram formato espiculado, semelhante a fibroblastos, e aderência ao plástico (Figura1). Sob ação da tripsina, se desprendiam, assumindo forma esférica, entretanto, ao se aderirem novamente a garrafa, novamente apresentavam-se fusiformes, características típicas de células tronco mesenquimais (Maltman *et al.*, 2011).

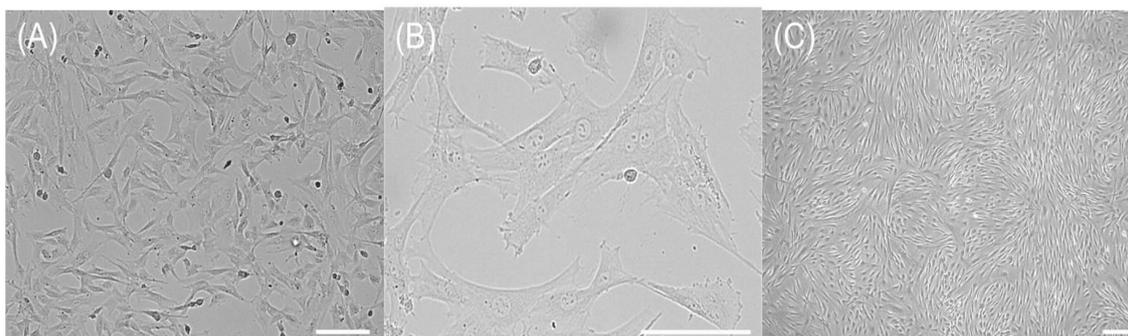


Figura 1. Fotomicroscopia da cultura celular. (A) Células com formato fusiforme, distribuídas em toda a garrafa de cultura, indicando aderência à superfície. (B) Maior aumento, células fibroblastóides, evidenciando o núcleo e os prolongamentos citoplasmáticos. (C) Menor aumento de cultura em quarta passagem, mostrando confluência celular acima de 80%. Barra = 100µm.

As CTM de quarta passagem, antes e após congelamento, foram submetidas a avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo, com uso dos anticorpos CD90, CD73, CD45, CD34, CD11, e MHC II. As células apresentaram alta expressão para CD90 e CD73, característicos de CTM, enquanto a expressão de CD45, CD34, CD11 e MHC II foram baixas. As médias dos resultados de cada anticorpo, pré congelamento, e após descongelamento com 30, 60 e 90 dias de criopreservação, estão especificadas na tabela 3.

Anticorpo	Pré Congelamento	30 dias	60 dias	90 dias
Branco	0,05%	5,87%	1,54%	1,22%
Secundário	3,13%	3,51%	2,36%	3,62%
CD11	6,94%	6,23%	3,16%	5,2%
CD34	3,47%	4,82%	5,2%	5,34%
CD45	6,15%	5,39%	2,89%	5,32%
MHCII	19,7%	6,22%	4,67%	5,83%

CD73	94,1%	85,7%	85,67%	95,1%
CD90	99,2%	90,3%	92,2%	83,4%

Tabela 3. Médias de marcação dos anticorpos CD11, CD34, CD45, MHCII, CD73 e CD90, das células tronco mesenquimais utilizadas, pré congelamento, e após descongelamento com 30, 60 e 90 dias de conservação.

A figura 2 mostra o gráfico com tais expressões imunofenotípicas antes do congelamento e após descongelamento das células, com 30, 60 e 90 dias de conservação.

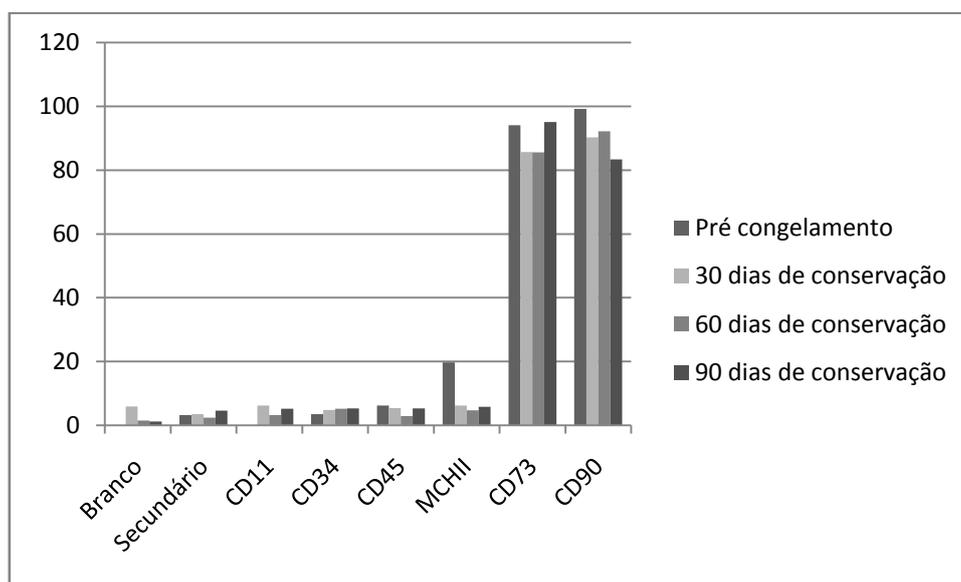


Figura 2. Gráfico com as médias de marcação dos anticorpos CD11, CD34, CD45, MHCII, CD73 e CD90, das células tronco mesenquimais utilizadas, pré congelamento, e após descongelamento com 30, 60 e 90 dias de conservação.

As células foram submetidas a diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica pelo uso de meios indutores, e foram capazes de tais diferenciações, conforme Dominici e colaboradores (2006), ilustradas na figura 3 a seguir:

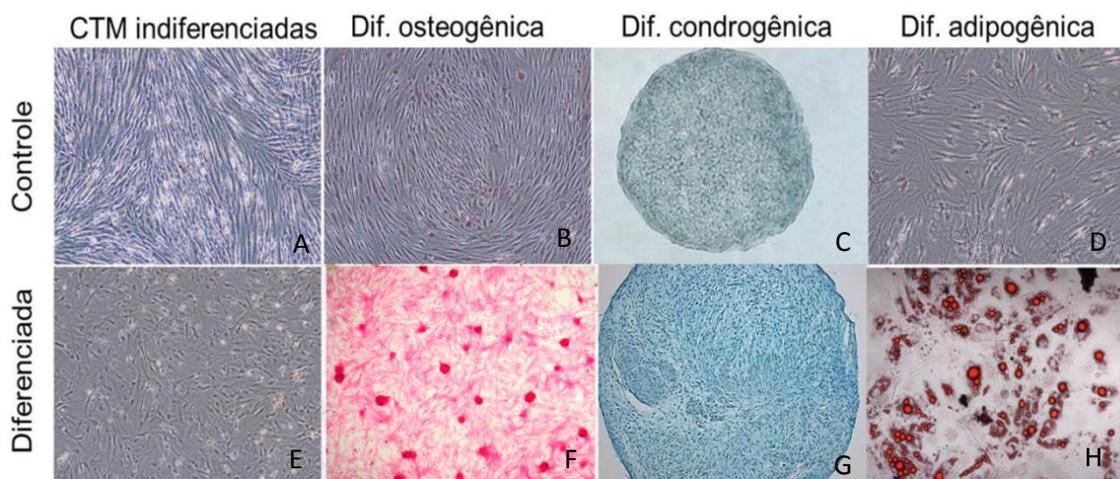


Figura 3. Fotomicroscopia das células, antes e após diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. (A), (B), (C), (D), (E) células tronco indiferenciadas, (F) células submetidas a diferenciação osteogênica, (G) células submetidas à diferenciação condrogênica, (H) células submetidas à diferenciação adipogênica.

6.2 Avaliação clínica dos animais

Todos os animais apresentaram recuperação anestésica rápida e sem sinais de dor ou desconforto no pós operatório imediato. Em nenhum momento os animais apresentaram alterações comportamentais ou de apetite. No momento da retirada dos pontos de pele, sete dias após o procedimento, a ferida cirúrgica de todos os animais estava bem cicatrizada, sem sinais de infecção ou rejeição do material de sutura.

Dos 20 animais submetidos ao trauma medular, 12 (60%) apresentaram hematúria e/ou retenção urinária, sendo que dois (10%) apenas hematúria e cinco (25%) somente retenção. Assim, cinco animais (25%) apresentaram ambos os sinais. a hematúria persistiu, em média, por dois dias, já a retenção por quatro dias.

Logo após a eutanásia, a avaliação macroscópica das cavidades abdominais e torácica não evidenciou quaisquer alterações.

6.3 Avaliação da função motora segundo a escala BBB

A avaliação pelo método BBB se mostrou de fácil realização e não oneroso. O condicionamento prévio dos animais ao campo aberto facilitou a avaliação após o procedimento cirúrgico, pois eles se mostraram confortáveis e com bom nível de atividade, diferente das primeiras vezes que foram expostos a esta situação.

Na primeira avaliação, 24 horas antes do trauma, todos os animais apresentaram escore máximo (21), demonstrando que não tinham qualquer dificuldade locomotora anterior ao procedimento experimental. Tal pontuação se manteve, em todos os

tempos, para os animais do grupo controle negativo (CN), que foram submetidos apenas à laminectomia.

Na segunda avaliação, 24 horas após a injúria, todos os animais apresentaram paraplegia, com ausência total de movimentos em membros pélvicos ou, raramente, discreta movimentação de uma ou duas articulações. A avaliação número três, sete dias após o trauma, não foi muito diferente. Apenas nos animais do grupo de associação dos tratamentos (CDT+CTM) notou-se extensa movimentação de uma ou duas articulações, ou discreto movimento de três

Apenas existiu diferença estatística entre os escores atribuídos na quarta avaliação, 15 dias após o trauma. O grupo CDT+CTM apresentou passada plantar consistente, ainda que num geral, com apoio ocasional na face dorsal dos membros pélvicos, sendo a melhor recuperação entre os grupos, seguido pelo grupo que recebeu apenas condroitinase (CDT). Neste grupo notou-se menos coordenação dos movimentos, mas houve diferença estatística em relação aos grupos célula tronco (CTM) e controle positivo (CP). Entre os dois últimos não houve diferença, e os animais apenas apresentaram, aos 15 dias, movimento extenso de duas articulações ou discreto de três. Os escores de cada grupo estão representados no gráfico da figura 4:

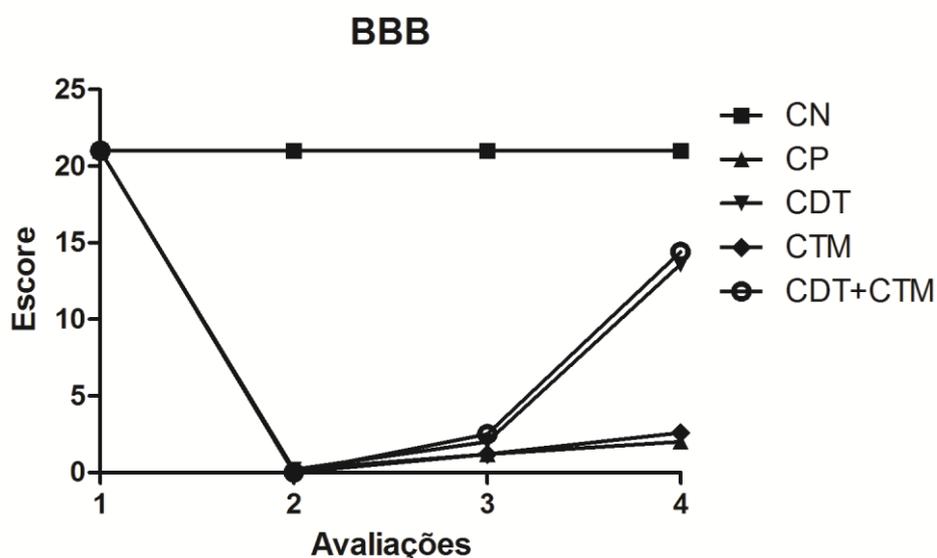


Figura 4. Gráfico da avaliação motora dos animais submetidos ou não ao trauma medular, tratados ou não, em quatro avaliações (Avaliações: 1=24 horas antes do procedimento, 2=24 horas depois, 3=7 dias depois e 4=15 dias depois; Grupos: CN=controle negativo, CP=controle positivo, CDT=condroitinase, CTM=células tronco mesenquimais, CDT+CTM= condroitinase e células tronco).

6.4 Avaliação gênica relativa de vimentina, VEGF, PECAM-1, TGF- β e BDNF por PT-PCR

O grupo controle positivo (CP) apresentou maior expressão gênica relativa de vimentina que os demais grupos. Dentre os animais que receberam tratamento, não houve diferença estatística entre os grupos de condroitinase com células tronco mesenquimais (CDT+CTM) e os tratamentos isolados. O gráfico a seguir ilustra a expressão de vimentina (figura 5).

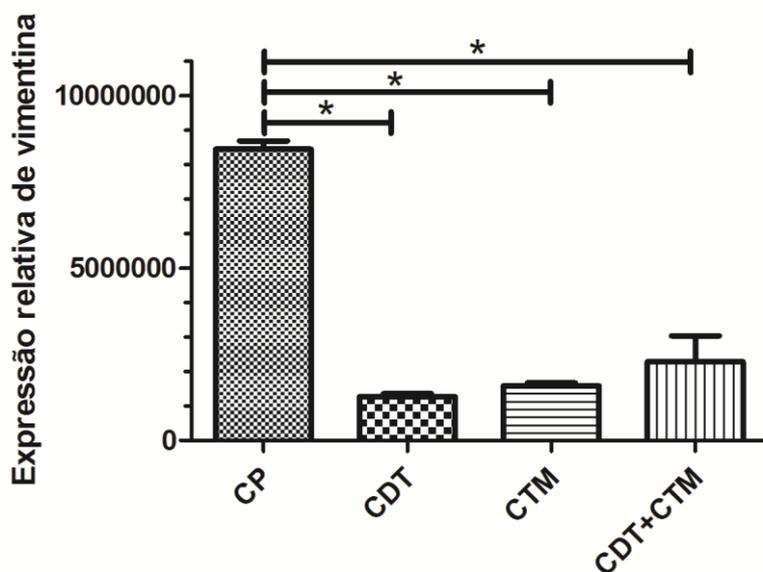


Figura 5. Gráfico da expressão gênica de vimentina dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).

Quanto à expressão de VEGF, não houve diferença estatística entre os grupos, apesar de ter sido maior no grupo CDT+CTM. Também não houve diferença na expressão de TGF- β , mesmo o grupo CDT tendo expressado mais que o restante, conforme os gráficos a seguir (figuras 6 e 7).

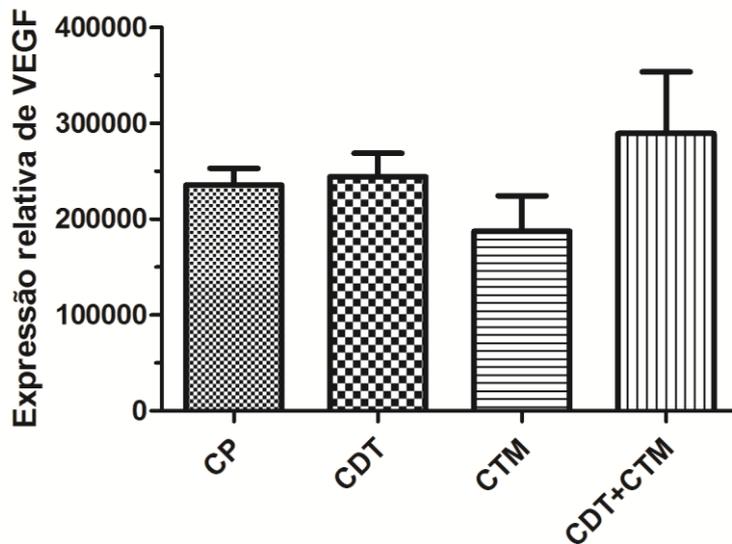


Figura 6. Gráfico da expressão gênica de VEGF dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).

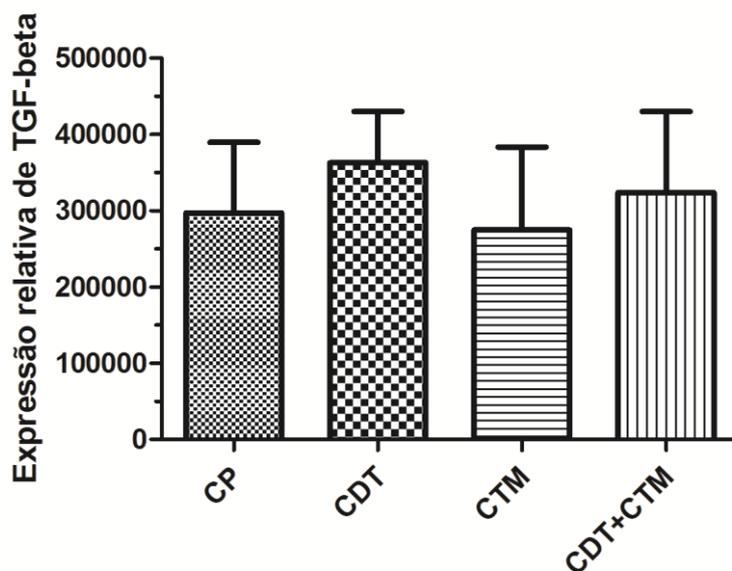


Figura 7. Gráfico da expressão gênica de TGF- β dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).

Os grupos tratados CDT+CTM e CDT apresentaram maior expressão gênica de PECAM-1 em relação ao grupo controle, que foi estatisticamente semelhante ao grupo CTM, representados a seguir (figura 8).

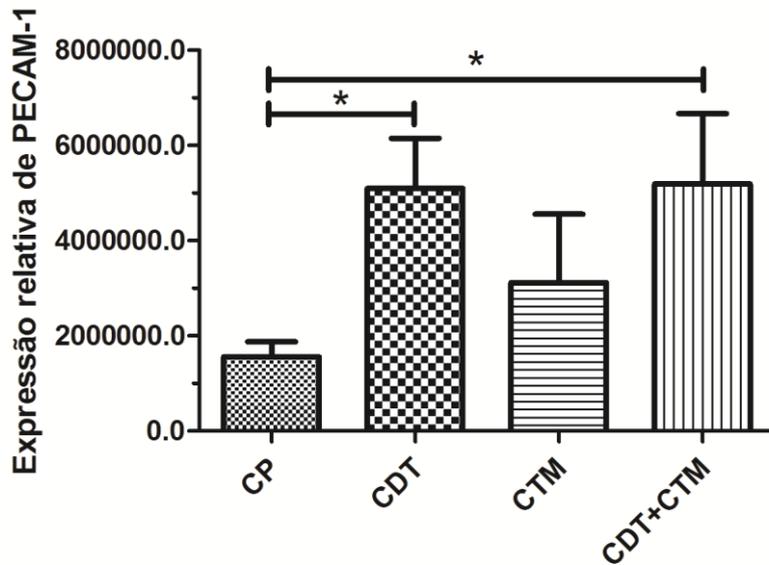


Figura 8. Gráfico da expressão gênica de PECAM-1 dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).

Quanto ao BDNF, os animais dos grupos CDT e a associação CDT+CTM foram diferentes dos grupos CP e CTM, semelhantes entre si, conforme gráfico da figura 9.

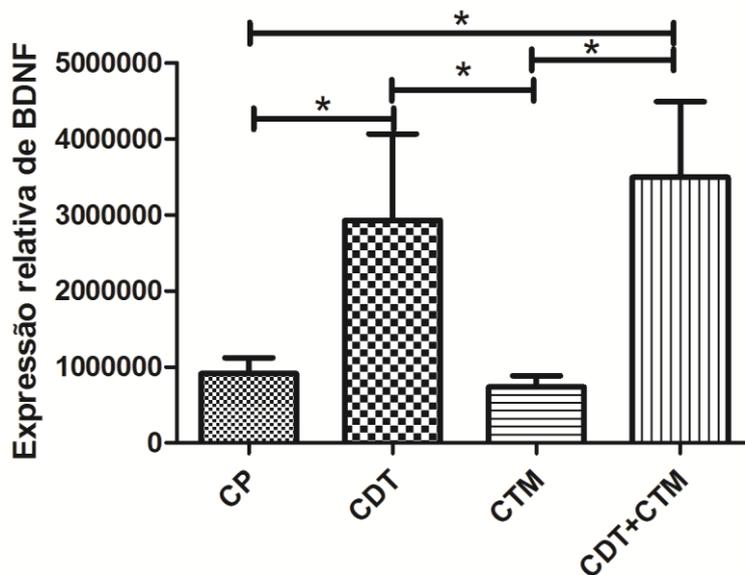


Figura 9. Gráfico da expressão gênica de BDNF dos grupos controle positivo (CP), condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e condroitinase associada a células tronco mesenquimais (CDT+CTM).

7. Discussão

A coleta de tecido adiposo dos animais, para isolamento de células tronco mesenquimais, se mostrou de fácil execução. A retirada de tecido adiposo retroperitoneal é de acesso cirúrgico simples, feito por meio de celiotomia em linha média.

O crescimento das células de tecido adiposo foi rápido, e estas demonstraram características típicas de CTM, como formato fibroblastóide e aderência ao plástico. Além disso, foram capazes de se diferenciar em tecidos ósseo, condrogênico e adiposo, conforme descrito por Dominici e colaboradores em 2006. Entretanto, para confirmação, foi realizada citometria de fluxo, que demonstrou alta expressão de CD73 e CD90, característicos das CTMs, e baixa para CD11, CD34, CD45 e MHCII, presentes em precursores hematopoiéticos, resultados semelhantes aos obtidos também por Dominici (2006) e por Maltman e outros pesquisadores em 2011. Tais características se mantiveram após descongelamento, o que permitiu a administração das células.

Os animais submetidos ao procedimento experimental apresentaram rápida recuperação anestésica, sem sinais de dor ou desconforto, possivelmente por satisfatório plano anestésico obtido pelo isoflurano e efeito analgésico proveniente do emprego da morfina preempitiva. A ausência de sinais de alterações comportamentais no pós-operatório tardio possivelmente deve-se a administração de morfina e posteriormente cloridrato de tramadol. Outro fator foi a assepsia com que se realizou as intervenções cirúrgicas, que também evitou infecções da ferida, já que não se utilizou antibióticos após o procedimento.

O modelo de trauma experimental foi escolhido por permitir exposição medular, e assim, a aplicação da condroitinase no local da lesão. Este se mostrou eficiente e de fácil execução, conforme descrito por Torres e seus colaboradores em 2010. Além disso, o aparelho utilizado causa trauma compressivo que reproduz de forma mais fidedigna os eventos secundários, vistos na rotina clínica, contrapondo aqueles traumas lacerantes, que limitam crânio e caudalmente a extensão dos eventos que intensificam a injúria medular (Oliveri *et al*, 2014). Modelos experimentais apenas com laceração do tecido são comumente utilizados, pois lesões medulares em humanos podem ser puramente lacerantes, mas a combinação deste mecanismo com contusão/compressão é mais comum, mesmo em pessoas (Hagg e Oudega, 2006).

O uso da micro bomba de infusão, acoplada a seringa de Hamilton, permitiu que a aplicação da condroitinase ou PBS intramedular fosse feita de forma lenta e na dose determinada. A via de aplicação intramedular foi de fácil execução, pode ser considerada segura e não interfere na intensidade do traumatismo, já que os animais do grupo CDT não apresentaram diferenças de função motora em relação ao grupo CTM, que recebeu PBS por essa via. Corroboram com esse achado os estudos realizados por Iseda em 2008.

Optou-se pela aplicação da enzima imediatamente após o trauma pois, segundo Karimi-Abdolzarrae e Billakanti (2012), os efeitos iniciais da formação da cicatriz glial, apesar de já considerados benéficos, causam prejuízo à regeneração neural. Além disso, a condroitinase é capaz de digerir as PGSCs por semanas após a aplicação (Iseda *et al*, 2008). Shields e colaboradores (2008) avaliaram os efeitos da condroitinase, em duas doses diferentes, na injúria medular, com cinco aplicações por via intratecal, em dias alternados, tendo iniciado o tratamento uma hora após o trauma. Ambos os tratamentos apresentaram maior crescimento axonal e inibição das PGSCs em relação ao grupo não tratado.

As CTM foram administradas por via endovenosa pois esta via de aplicação é considerada minimamente invasiva (Osaka *et al*, 2010), não exigindo intervenção cirúrgica ou a necessidade de centro cirúrgico para sua realização (Oliveri *et al*, 2014). Segundo Lalu e outros pesquisadores (2012) a aplicação de CTM por via endovenosa não causa toxicidade, apesar de relatados casos de febre após a administração em ratos, ainda que sem seqüelas a longo prazo. Os mecanismos de migração das CTM para a injúria não foram ainda esclarecidos, mas sabe-se que as células são atraídas para o processo inflamatório (Sykova e Jendelová, 2007). Assim, torna-se desaconselhável a aplicação endovenosa nos casos crônicos, uma vez que nestes, o processo de inflamação já teria cessado (Oliveri *et al*, 2014). Entretanto, Kim e outros pesquisadores (2013) testaram a aplicação de células já na fase crônica, por via endovenosa e intramedular, e as resposta foram semelhantes, com recuperação motora, sugerindo que a migração das células aconteça mesmo na ausência de processo inflamatório agudo. Kang e colaboradores (2012) compararam a resposta clínica da aplicação endovenosa e intralesional de CTM após trauma medular, e a primeira apresentou melhor recuperação funcional.

A dose de células tronco administrada nos animais dos grupos CTM e CDT+CTM foi de 1×10^6 células, em 0,5 mL. Osaka e colaboradores (2010), empregaram a mesma

dose, vários tempos de aplicação após o trauma compressivo foram avaliados (6 horas, 1 dia, 3 dias, 7 dias, 10 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias), sendo encontradas melhores respostas na aplicação com menor intervalo. Portanto, propôs a redução do intervalo entre o trauma e a aplicação para três horas.

A lesão experimental, devido a sua localização em T12, danifica as vias descendentes e aferentes da medula lombossacra, localização de circuitos neurais dos quais dependem as funções do trato urinário, como o núcleo parassimpático, projeções aferentes da bexiga e fibras motora somáticas dorsolaterais, comprometendo a micção (Mitsui *et al*, 2005). Entretanto os animais não apresentaram cistite clínica, o que pode ser atribuído à expressão vesical manual realizada no pós operatório, evitando que a urina ficasse retida na bexiga por períodos prolongados.

Optou-se pela avaliação de função motora com uso da escala de BBB por ser um método viável de execução, não requerendo equipamentos onerosos e aceitável na experimentação com ratos (Ma *et al*, 2001), além de permitir avaliação completa e detalhada (Muir e Webb, 2000). O condicionamento dos animais, antes do procedimento, reduziu o estresse no momento da avaliação, e permitiu melhor visualização da movimentação, já que estes estavam mais ativos do que na primeira exposição ao campo aberto.

O procedimento de laminectomia não causou déficit neurológico nos animais do grupo CN, e a avaliação pela escala de BBB se manteve máxima mesmo após o procedimento, demonstrando que a técnica foi executada de forma correta e cuidadosa, não acarretando lesões na medula perceptíveis clinicamente. O trauma medular causou paraplegia em todos os animais, demonstrado pelos baixos escores de avaliação motora compatíveis com trauma medular grave.

Apesar de os animais tratados não alcançarem escore máximo, possivelmente pelo curto período de avaliação, houve recuperação dos grupos CDT+CTM e CDT em relação ao grupo controle. A recuperação da função motora depende da suficiente interação das vias remanescentes, regeneração e brotamento axonal, e da plasticidade do tecido após a injúria (Rossignol e Frigon, 2011). No presente experimento, como o grupo das CTM foi semelhante ao grupo CP, pode-se sugerir que a condroitinase foi determinante para tal recuperação, possivelmente pela inibição da cicatrização glial, promovendo a plasticidade. Além disso, os efeitos da terapia celular foram favorecidos pela enzima, determinando a melhor recuperação do grupo CDT+CTM em relação aos demais. Huang *et al* (2006), utilizando apenas a enzima,

somente notaram recuperação do grupo tratado partir de três semanas de avaliação. Tom e colaboradores (2009) obtiveram apenas a recuperação axonal, sem incremento na função motora. Utilizando apenas as CTM, estudos anteriores relatam resposta funcional apenas com três (Liu *et al*, 2013) ou quatro semanas (Spejo *et al*, 2013) em relação a animais tratados com placebo.

Essa diferença de recuperação, com incremento na resposta da função motora, pode estar relacionada com os tempos de administração, tanto da enzima quanto das células, pode ter contribuído para um sinergismo de efeitos, resultando em melhores efeitos regenerativo e neuroprotetor.

A injúria medular causada pelo trauma experimental causou reação astrocitária acentuada, demonstrada pela alta expressão gênica relativa de vimentina nos animais do grupo controle positivo (CP). Os tratamentos utilizados, condroitinase (CDT), células tronco mesenquimais (CTM) e a associação destes (CDT+CTM), foram capazes de modular a astrogliose, evidenciado pela redução significativa de vimentina nestes grupos. Entretanto, não houve diferença entre eles. A vimentina é o principal componente dos filamentos intermediários de astrócitos imaturos, sendo substituída, após as primeiras semanas de vida, pelo GFAP. Em astrócitos reativos ou com transformação neoplásica, a vimentina volta a ser expressa, mesmo na fase adulta (Schiffer *et al*, 1986). Bondan *et al* (2013), após aplicação de brometo de etídeo, um agente gliotóxico, em tronco encefálico de ratos, identificaram maior imunomarcagem de vimentina nas margens imediatas da área de injúria, enquanto de GFAP nos astrócitos mais distantes dos bordos da lesão. A marcação de ambos, vimentina e GFAP, foram maiores nos animais que sofreram injúria pelo brometo de etídeo do que nos animais que se aplicou solução salina, como controle negativo.

Por outro lado, a quebra das PGSCs pela condroitinase resulta na liberação de 6-sulfato dissacarídeo, que tem ação imunomoduladora sobre a micróglia (Rolls *et al*, 2008), o que pode explicar a baixa detecção de vimentina no grupo tratado com a enzima. A expressão também foi reduzida no grupo CTM, indicando redução da ativação astrocitária, assim como no estudo de Spejo *et al* em 2013, que identificou redução de GFAP no trauma compressivo, após aplicação de células tronco. Porém, Boido e colaboradores (2012), concluíram que apesar das células tronco terem reduzido a formação de cistos gliais, elas não foram capazes de diminuir o GFAP e conseqüentemente, a astrogliose. No presente estudo, esperava-se que a condroitinase tivesse efeito sinérgico as CTM na modulação da astrogliose, entretanto, o grupo CDT+CTM apresentou maior expressão de vimentina entre os grupos

tratados, apesar de não haver significado estatístico ressalta-se que somente a redução da expressão de vimentina não foi capaz de determinar efeito neuroprotetor, dentro do tempo avaliado, visto que os animais do grupo CTM tiveram baixos níveis, mas sem recuperação motora.

Considerando o TGF- β , esperava-se que os animais tratados com condroitinase, células tronco e a associação destas, tivesse aumento desta citocina, uma vez que houve uma redução da astrogliose, identificada pela reduzida expressão de vimentina nestes grupos. Porém o TGF- β é uma citocina que parece ter papel dúbio no processo inflamatório do trauma medular. Enquanto inibe os efeitos das células mononucleares fagocíticas estimula fibroblastos e astrócitos (Grande, 1997). Hamada et al (1996) identificaram resposta funcional mais rápida em animais que receberam TGF- β por via intratecal, após traumatismo medular, em relação ao grupo placebo. Entretanto, após 35 dias, as medulas foram avaliadas, e a cicatriz glial formada pelo grupo tratado foi maior do que no grupo sem tratamento, e a função motora se igualou aos 30 dias.

Outro fator que pode ter influenciado a avaliação do TGF- β foi que a coleta da medula ocorreu 15 dias após o trauma. Tonai e seus colaboradores (1994), relataram que o nível máximo de detecção se dá quatro horas após o trauma, retornando aos níveis basais com 18 horas, já Semple-Rowland et al (1995) encontraram máxima expressão sete dias após injúria. Apesar das controversas sobre seu pico de liberação, a dosagem do TGF- β ocorreu após os possíveis picos.

Em relação as PGSCs, em estudo anterior, a inibição de receptores de TGF- β em astrócitos *in vitro* reduziu a produção das proteoglicanas (Hsiao et al, 2013). Confrontando com os achados do presente experimento, tal redução não parece estar associada à expressão de vimentina, já que os animais que tiveram diminuição desta não demonstraram alteração da indução de TGF- β em relação ao grupo CP.

A angiogênese não tem efeito significativo no resultado final da injúria medular, mas sim na capacidade de reparação espinhal, e seu principal indutor é o VEGF (Hagg e Oudega, 2006). Não houve diferença na expressão de VEGF entre os grupos estudados, entretanto, na literatura consultada, não se sabe quando seria seu pico de expressão, podendo ser diferente do tempo de avaliação. Assim, não se pode concluir a participação ou não do VEGF na resposta funcional dos animais dos grupos CDT+CTM e CDT, sendo que esperava-se que estes apresentassem altos níveis deste fator, já que foi demonstrado que o VEGF tem efeitos neuroprotetores e induz os neurônios a produzirem neurotrofinas com mesmo efeito (Jim et al, 2002). Jim e colaboradores (2000) estudaram a neuroproteção do VEGF em culturas celulares de

linhagem neural que foram privadas de glicose e oxigênio. A cultura que recebeu VEGF teve o dobro de células sobreviventes ao estresse de privação. Em estudo *in vivo*, o VEGF foi capaz de reduzir a área de infarto encefálico em ratos (Jin *et al*, 2003). No trauma medular, Kim e outros pesquisadores (2009) aplicaram células tronco geneticamente modificadas para alta expressão de VEGF. Em duas semanas notaram maior proliferação celular nas medulas dos animais do grupo tratado, e as seis semanas maior densidade de vasos sanguíneos. Entretanto, Benton e Whittemore (2003) observaram efeito deletério da aplicação do fator. Com aumento da permeabilidade vascular e infiltração leucocitária, houve maior volume de lesão espinhal nos animais tratados, seis semanas após a injúria.

Outro gene que parece estar envolvido na angiogênese, o PECAM-1. Trata-se de uma molécula de adesão endotélio plaquetária, membro da super família e imunoglobulinas, expressa em plaquetas, monócitos, neutrófilos e células T circulantes (Albelda *et al*, 1991), não presente em fibroblastos, músculos ou outras células não vasculares (Newman, 1997), sendo um usual marcador celular do endotélio vascular (Mahoney *et al*, 2009). A maior expressão detectada nos grupos CDT e CDT+CTM poderia sugerir um processo de neovascularização mais avançado nestes grupos. Porém, não se poderia atribuir essa alta expressão de PECAM-1 à angiogênese, uma vez que o mesmo não aconteceu com o VEGF. Entretanto, estes mesmos grupos tiveram melhor recuperação funcional no teste comportamental. Sabe-se que a isquemia está diretamente relacionada com a gravidade da injúria medular (Kund *et al*, 2013), e a maior detecção de PECAM-1 nos grupos citados poderia indicar maior vascularização nestes animais. Sugere-se então que interações de adesão de células endoteliais sejam fundamentais ao processo de angiogênese. A aplicação de anticorpo anti-PECAM impediu a neovascularização em córnea de ratos, relacionando este gene à formação de novos vasos (Delisser *et al*, 1997).

Dentre as neurotrofinas, responsáveis pelo bom funcionamento do sistema nervoso, a mais abundante é o BDNF, que possui efeito anti apoptótico (Han *et al*, 2012). As neurotrofinas também são essenciais para a sobrevivência celular, desenvolvimento e plasticidade neuronal (Chen *et al*, 2005). Sabe-se que há estímulo para sua liberação após compressão (Ikeda *et al*, 2002), possivelmente como resposta do organismo, devido ao efeito neuroprotetor desses fatores (Qin *et al*, 2006; He *et al*, 2013). Em 2002, Ikeda e colaboradores utilizaram BDNF e uma segunda neurotrofina, a NT-3, no trauma medular, e observaram melhora funcional dos animais tratados.

As CTM parecem aumentar a quantidade de BDNF e outras neurotrofinas, e o efeito neuroprotetor das células possivelmente está associado a esse fato (Rodrigues Hell, 2009). Entretanto, ainda não se sabe se as próprias células liberam essas substâncias, ou se induzem a liberação por efeito parácrino (Osaka *et al*, 2010). Wright e outros pesquisadores (2011) identificaram que a cicatriz glial, devido a presença das PGSCs, inibe a ação do BDNF. O presente estudo corrobora com esse achado, já que houve maior expressão desta neurotrofina, assim como recuperação motora, nos animais dos grupos CDT+CTM e CDT, nesta ordem. Além disso, a maior expressão de BDNF nestes grupos sugere que a enzima condroitinase foi a responsável por esse aumento, uma vez que o grupo CTM isolado foi semelhante ao CP, tanto na expressão de BDNF quanto na função motora.

8. Conclusões

O modelo de trauma experimental promoveu injúria medular grave, com paraplegia e indução de astrogliose, verificada pelo aumento da expressão gênica de vimentina. Em contra partida, tal expressão foi reduzida pelos tratamentos propostos, apesar de não haver sinergismos na associação de condroitinase e CTM.

A aplicação de condroitinase isoladamente e associada as CTM promoveu maior vascularização da medula lesada, verificada pela maior expressão gênica de PECAM-1, apesar de não alterar os níveis de VEGF, no momento da avaliação. Os mesmos tratamentos aumentaram a expressão de BDNF, sendo a associação ainda mais eficiente.

Os tratamentos com condroitinase isoladamente e sua associação as CTM promoveram recuperação funcional precoce dos animais tratados.

9. Considerações finais

Mesmo com o avanço da ciência e da experimentação animal, o trauma medular permanece com prognóstico desfavorável. Entretanto, os resultados do presente estudo podem aumentar as esperanças a cerca do futuro desta afecção. A recuperação precoce dos animais tratados com condroitinase, isoladamente e em associação às células tronco mesenquimais, reforçam as boas expectativas quanto a manipulação da cicatriz glial para obtenção de melhores desfechos nestes casos.

Porém, ainda há muito a ser esclarecido, como qual o melhor intervalo após a injúria medular para tal intervenção. Ou ainda pode-se questionar qual o período de duração

do efeito dos tratamentos e o número ideal de aplicações, tanto da enzima quanto das células. Além disso, não se sabe ao certo qual a segurança a longo prazo destas terapias.

A nível molecular, as dúvidas se tornam mais numerosas ainda, por exemplo, qual o real papel das citocinas na regeneração axonal e indução da inflamação e reação astrocitária. O quanto as células transplantadas secretam destas citocinas e o quanto induzem as células do organismo hospedeiro a liberá-las e ainda, se há diferença funcional de acordo com esta origem.

Assim, mais estudos se fazem necessários antes que tais tratamentos sejam amplamente aplicados à rotina clínica, tanto na Medicina Veterinária, quanto na Medicina Humana.

10. Referências

ALBELDA, S.M.; MULLER, W.A.; BUCK, C.A.; *et al.* Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, v. 114, n. 5, p. 1059-68, 1991.

ARIAS, M.V.B., SEVERO, M.S., TUDURY, E.A. Trauma Medular em Cães e Gato – Revisão da Fisiopatologia e do Tratamento Médico. *Semina*, v. 28, n. 1, p 115-1134, 2007.

BAGLEY, R. S.; HARRINGTON, M. L., SILVER, G. M.; CAMBRIDGE, A.J., CONNORS, R.L. MOORE, M.P. Exogenous Spinal Trauma: Clinical Assessment and Initial Management. *Veterinary Neurology*, v. 21, n. 12. P 1138-1143, 1999.

BARTHOLDI, D.; SCHWAB M.E. Expression of proinflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Europ. J. of Neurosc.*, v. 9, p. 1422-1438, 1997.

BASU, S.; HELLBERG, A.; ULUS, A.T.; *et al.* Biomarkers of free radical injury during spinal cord ischemia. *FEBS Letters*, v. 508, p. 36-38, 2001.

BERGMAN, R., LANZ, O., SHELL, L. A Review of experimental and clinical treatments for acute spinal cord injury. *Veterinary Medicine, Chicago*, p. 855-866, 2000.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLE, I.; *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stroma cell. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315-17, 2006.

BASSO D.M.; BEATIE, 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

BENTON, R.L.; WHITTEMORE, S.R. VEGF 165 therapy exacerbates secondary damage following spinal cord injury. *Neuroch Resea*, v. 28, n. 11, p. 1693-1703, 2003.

BOIDO, M.; GARBOSSA, D.; FONTANELLA, M.; *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation reduces glial cyst and improves functional outcome after spinal cord compression. *World Neurosurg*, p. 1-8, 2012.

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

BRAUND, K.G. Braund's clinical neurology in small animals: localization, diagnoses and treatment. *Traumatic disorders*, p.193-205, 1993.

BRAUND, K.G. Acute Spinal Trauma. In: BOJRAB, M.S. *Disease Mechanisms in Small Animals Surgery*. 2 ed. Lippincott: Williams & Wilkins, Cap. 152, p. 1140-1157, 2003.

BUSCH, S.A.; SILVER J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, v. 17, p. 120-27, 2007.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células tronco mesenquimais. *Rev Bras de Hematol e Hemoterap.* v, 31, p. 25-35, 2009.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal Stem Cell. *J. Orthop. Research.* n. 5, v. 9, p. 641-50, 1991.

CHEN, Q.; LONG, Y.; YUAN, X. *et al.* Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *J. Neurosci. Res.*, v. 80, p. 611-19, 2005.

CHO, J.S.; PARK, H.W.; PARK, S.K.; *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cell enhances axonal outgrowth and cell survival in an organotypic spinal cord slice culture. *Neurosc Letters*, v. 454, p. 43-8, 2009.

CREGG, J.M.; DEPAUL, M.A.; FILOUS, A.R.; *et al.* Functional regeneration beyond the glial scar. *Experiment Neurol*, v. 253, p. 197- 207, 2014.

CRESPO, D.; ASHER, R.A.; LIN, R.; *et al.* How does chondroitinase promote functional recovery in damaged CNS? *Exper Neurol*, v. 206, p. 159-71, 2007.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.*, v. 28, p. 875-84, 2000.

DELISSER, H.M.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; STRIETER, R.M.; *et al.* Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Amer J Pathol*, v. 151, n. 3, p. 671-77, 1997.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, p. 315-17, 2006.

DRAGO, D.; COSSETTI, C.; IRACI, N.; *et al.* The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*, v. 95, p. 2271-85, 2013.

FRIENDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, K.S.; LALYKNA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, v. 3, p. 393-403, 1970.

GOLDBERG, M.P.; CHOI, D.W. Combined oxygen and Glucose Deprivation in cortical Cell Culture: Calcium-dependent and Calcium-independent Mechanisms of Neural Injury. *J. of Neurosc.* n. 13, v. 8, p. 3.510 - 24, 1993.

GRANDE, J.P. Role of transformin growth factor- β in tissue injury and repair. *P Soc Exp Biol Med*, v. 214, p. 27-40, 1997.

GRILL, R. J. User-defined variables that affect outcome in spinal cord contusion/compression models. *Exp. Neurol.*, v. 196, p. 1-5, 2005.

HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative process after spinal cord injury. *J Neurotr*, v. 23, n. 3/4, p. 264-80, 2006.

HAMADA, Y.; IKATA, T.; KATOH, S. *et al.* Effects of exogenous transforming growth factor- β 1 on spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*, v. 203, p. 97-100.

HAN, X.; YANG, N.; CUI, Y. *et al.* Simvastatin mobilizes bone marrow stromal cells migrating to injured areas and promotes functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett.*, v. 521, p. 136-141, 2012.

HE, B. L.; BA, Y. C.; WANG, X. Y.; *et al.* BDNF expression with functional improvement in transected spinal cord treated with neural stem cells in adult rats. *Neuropeptides*. v.47, n.1, p.1-7, 2013.

HONMOU, O.; ONODERA, R.; SASAKI, M.; *et al.* Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Tren Mol Med.*, v. 18, n. 5, p. 291-97, 2012

HSIAO, T.W.; SWARUP, V.P.; KUBERAN, B., *et al.* Astrocytes specifically remove surface-adsorbed fibrinogen and locally express chondroitin sulfate proteoglycans. *Acta Biomater*, 9, p. 7.200-08, 2013.

HUANG. W. C.; KUO, W. C.; CHERNG, J. H. *et al.* Chondroitinase ABC promotes axonal re-growth and behavior recovery in spinal cord injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 349, p. 963-968, 2006.

HYMAN, C.; HOFER, M.; BARDE, Y.A.; *et al.*, BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, v. 350, p. 230 - 32, 1991.

IKEDA, O.; MURAKAMI, M., INO, H.; *et al.* Acute up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression resulting from experimentally induced injury in the rat spinal cord. *Acta Neuropathol.*, v.102, p.239-45, 2001.

ISEDA, T.; OKUDA, T.; KANE-GOLDSMITH, N.; *et al.* Single, high-dose intraspinal injection of chondroitinase reduces glycosaminoglycans in injured spinal cord and promotes corticospinal axonal regrowth after hemisection but not contusion. *J. Neurotrauma*, v. 25, p. 334-349, 2008.

JANSSENS, L.A.A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. *J Small Anim Pract*, v. 32, p. 572-78, 1991.

JEFFERY, N.D., BLAKEMORE, W.F. Spinal Cord Injury in Small Animals. *Veterinary Record*, v. 145, n. 7, p. 183-190, 1999.

JIN, K.L.; MAO, X.O.; GREENBERG, D.A. Vascular endothelial growth factor: Direct neuroprotective effect *in vitro* ischemia. *Neurobiology*, n. 18, v. 97, p. 10.242-47, 2000.

JIN, K.L.; ZHU, Y.; SUN, Y.; MAO, X.O.; XIE, L.; GREENBERG, D.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* e *in vivo*. *Neurobiology*, n. 18, v. 19, p. 11.946-50, 2002.

KANG, E. S.; HA, K. Y.; KIM, Y. H. Fate of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells following spinal cord injury in rats by transplantation routes. *J. Korean Med Sci.*, v.27, n.6, p.586-593, 2012.

KARIMI-ABDOLREZAEI, S.; BILLAKANTI, R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury- beneficial and detrimental effects. *Mol Neurobiol*, v. 46, p. 251-64, 2012.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cell from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cell*, v. 24, p. 1294-1301, 2006.

KIM, K. K.; ADELSTEIN, R. S.; KAWAMOTO, S. Identification of Neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J. Biol. Chem*, v. 284, p. 31052–61, 2009.

KIM, J. W.; HA, K. Y.; MOLON, J. N.; *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intralesional and intravenous transplantation. *Spine*, v.38, n.17, p.1065-74, 2013.

KUND, S.; BICKNELL, R.; AHMED, Z. Spinal cord injury: current mammalian models. *Amer. J. Neurosc.* n. 4, v. 1. p. 1-12, 2013.

KUND, S.; BICKNELL, r.; AHMED, Z. The role of angiogenic and wound-healing factors after spinal cord injury in mammals. *Neurosc Research*, v. 76, p 1-9, 2013.

LALU, M.M.; MCINTYRE, L; PUGLIESE, C. *et al.* Safety cell therapy with mesenchymal stromal cells (safecell): a systematic review and meta analyses of clinical trials. *Plos One*, v. 7, disponível em plosone.org, acesso em 08 de fevereiro de 2014, publicado em outubro de 2012.

LECOUTEUR, R.A., GRANDY, J.L. Doenças da Medula Espinhal. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 5 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p. 684-687, 2008.

LIN, R.; ROSAHL, T.W.; WHITING, P.J. et al. 6-sulphated chondroitins have a positive influence on axonal regeneration. *Plos One*, v. 6, p.1-10, July 2011.

LIU, J.; CHEN, J.; LIU, B.; et al. Acellular spinal cord scaffold seeded with mesenchymal stem cells promotes long-distance axon regeneration and functional recovery in spinal cord injured rats. *J Neurol Sci*, v. 325, p. 127-36, 2013.

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.

MACHADO, G.F.; MAIORKA, P.C.; CANDIOTO, C.G.; et al. Immunohistochemical detection of GFAP and TGF- β in C57Bl6 mice during acute vascular stomatitis virus encephalites. *Acta Scient Veterinariae*, v. 34, p. 83-88, 2006.

MAHONEY, E.T.;BENTON, R.L.;MADDIE, M.A. et al. ADAM8 is selectively upregulated in endothelial cells and is associated with angiogenesis after spinal cord injury in adult mice. *J. Comp. Neurol.*, v. 512, p. 243-55, 2009.

MALTMAN, D. J.; HARDY, S. A.; PRZYBORSKI, S. A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem. Int.*, v. 59, p. 347-356, 2011.

MITSUI, T.; FISCHER, I.; SHUMSKY, J. S. et al. Transplants of fibroblasts expressing BDNF and NT-3 promote recovery of bladder and hindlimb function following spinal contusion injury in rats. *Exp. Neurol.*, v. 194, p. 410-431, 2005.

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

NEWMAN, P.J. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*, v. 99, n. 1, p. 3-8, 1997.

OLIVERI, R.S.; BELLO, S.; BIERING-SORENSE, F. Mesenchymal stem cell improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: Systematic review with meta-analyses of rat model. *Neurobiol Disease*. V. 62, p. 338-53, 2014.

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 Research*, v. 1343, p. 226-35, 2010.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p. 143-47, 1999.

QIN, D. X.; ZOU, X. L.; LUO, W.; *et al.* Expression of some neurotrophins in the spinal motoneurons after cord hemisection in adult rats. *Neurosci Lett.*, v.410, n.3, p.222-27, 2006.

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

ROLLS, A.; SHECHTER, R.; LONDON, A. *et al.* Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: A role in microglia/macrophage activation. *Plos Med.*, v. 5, p. 1262-1277, 2008.

ROSSIGNOL, S.; FRIGON A. Recovery of locomotion after spinal cord injury: some facts and mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 34, p. 413-440, 2011.

RHODES, K.E.; MOON, L.D.F.; FAWCETT, J.W. Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neurosci*, v. 120, p. 41-56, 2003.

SCHIFFER, D.; GIORDANA, M.T.; MIGHELI, A. *et al.* Glial fibrillary protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res*, 374, p. 110-18, 1986.

SEMPLE-ROWLAND, S.L.; MAHATME, A.; POPOVICH, P.G.; *et al.* Analyses of TGF-beta 1 gene expression in contused rat spinal cord using quantitative RT-PCR. *J Neurotr*, 12, p. 1003-14, 1995.

SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M.; *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluids. *Science*, n. 4587, v. 219, p. 983-985, 1983.

SHIELDS, L.B.E.; ZHANG, Y.P.; BURKE, D.A.; *et al.* Benefit of chondroitinase ABC on sensory axon regeneration in a laceration model of spinal cord injury in the rat. *Surg Neurol* v. 69, p. 568-77, 2008.

SILVER, J.; MILLER, J.H. Regeneration beyond the glial scar. *Nature*, v. 5, p. 146-56, 2004.

SOUZA, C.F.; NAPOLI, P.; HAN, S.W.; *et al.* Células tronco mesenquimais: células ideais para regeneração cardíaca? *Rev Bras Cardiol Invasiva*, v. 18, p. 344-53, 2010.

SPEJO, A.B.; CARVALHO, J.L.; GOES, A.M.; OLIVEIRA, A.L.R. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cell on spinal motoneurons following ventral root axotomy: sypase stability and axonal regeneration. *Neurosc*, v. 250, p. 715-32, 2013.

SUGAHARA, K.; KITAGAWA, H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr Opin Struct Biol*, v. 10, p. 518-27, 2000.

SUGAHARA, K.; MIKAMI, T.; UYIAMA, T.; MIZUGUSHI, S.; *et al.* Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol*, v. 13, p. 612-20, 2003.

SUN, Y, JIN K.; XIE, L.; CHILDS, J.; *et al.* VEGF induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *The J. Clin. Invest.*, n. 12, v. 111, p. 1.843-50, 2003.

SYKOVÁ, E; JENDELOVÁ, P. Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS. *Cell Death Differ.*, v. 14, p. 1336-1342, 2007.

TAKEUCHI,H.; NATSUME, A.; WAKABAYASHI, T. *et al.* Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1- and HGF-dependent manner. *Neurosci. Lett.*, v. 426, p. 69-74, 2007.

TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.*, v. 75, p. 15-26, 1991.

TONAI, T.; NISHISHO, T.; SHINNO, H. *et al.* Increased production of interleukin-1 and inhibition by glucocorticoid in rat spinal cord following compression injury. *Ann Scient Meeting Int Med Soc Paraplegia*, abstr, 1994.

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

TOHDA, C., KUBOYAMA, T. Current and future therapeutic strategies for functional repair of spinal cord injury. *Pharmacology & therapeutic*, Elsevier, 2011.

TOM, V.J.; STEINMETZ, M.P.; MILLER, J.H.; *et al.* Studies on the development and behavior of dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an *in vitro* model of the glial scar and after spinal cord injury. *J Neurosc*, v. 29, p. 6531-39, 2004

TOM, V. J.; HOULÉ, J. D. Intraspinal microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. *Exp. Neurol.*, v. 211, p. 315-319, 2008.

TOM, V. J.; KADAKIA, R.; SANTI, L. *et al.* Administration of chondroitinase ABC rostral or caudal to spinal cord injury site promotes anatomical but not functional plasticity. *J. Neurotrauma*, v. 26, p. 2323-2333, 2009.

UCCELI, A.; BENVENUTO, F.; LARONI, A.; GIUNTI, D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cell. *Best Pract and Research Clin Hematol*, v. 24, p. 59-64, 2011.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F. *et al.* Statistical analysis of real-time PCR data. *B. M. C. Bioinformatics*, v. 7, 2006. < <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/85>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2014.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies. *Tissue Engineering*, n.2, v. 7, p. 211-28, 2001.

ZUTTON, M.S.S.R.; WENCESLAU, C.V.; LEMOS, P.A.; *et al.* Células tronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré clínica. *Rev Bras Cardiol Invasiva*, v. 21, p. 281-7, 2013.

