



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Fernando Swiech Bach

**AVALIAÇÃO SENSITIVA E MOTORA DE CÃES COM LESÃO MEDULAR  
AGUDA, SUBMETIDOS À DESCOMPRESSÃO CIRÚRGICA E TRANSPLANTE DE  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

*(Sensitive and motor evaluation of dogs with acute spinal cord injury, submitted to surgical decompression and transplantation of mesenchymal stem cells)*

**Curitiba, PR  
SETEMBRO DE 2017**

**FERNANDO SWIECH BACH**

**AVALIAÇÃO SENSITIVA E MOTORA DE CÃES COM LESÃO MEDULAR AGUDA,  
SUBMETIDOS À DESCOMPRESSÃO CIRÚRGICA E TRANSPLANTE DE CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: Prof. Dr. José Ademar Villanova Jr.

**CURITIBA**

**MAIO 2017**

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

FERNANDO SWIECH BACH

### **AVALIAÇÃO SENSITIVA E MOTORA DE CÃES COM LESÃO MEDULAR AGUDA, SUBMETIDOS À DESCOMPRESSÃO CIRÚRGICA E TRANSPLANTE DE CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS**

Aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 0998.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

---

Prof. Dr. José Ademar Villanova Junior  
Orientador – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, PUCPR

---

Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias  
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, PUCPR

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio  
Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, USP, Campus Pirassununga.

Curitiba, 21 de Maio de 2017.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1** - Análise imunofenotípica por citometria de fluxo. Os histogramas azuis indicam a porcentagem da população positiva para cada anticorpo enquanto os histogramas vermelhos indicam o controle isotípico dos anticorpos.

**Figura 2** – Transplante das células-tronco por via epidural, logo após retirada do material discal.

**Gráfico 1** - Medianas em dias para recuperação da locomoção nos diferentes grupos.

**Gráfico 2** - Medianas referentes aos dias de internação pós cirurgia, nos diferentes grupos.

**Quadro 1** - Índices de recuperação e de recorrência dos sinais em cães com diferentes graus de lesão neurológica toracolombar, quando submetidos aos tratamentos conservador ou cirúrgico.

**Quadro 2** - Lista de anticorpos de superfície celular utilizados na citometria de fluxo.

**Tabela 1** - Pacientes submetidos à descompressão cirúrgica.

**Tabela 2** - Pacientes submetidos à descompressão cirúrgica e transplante de CTM.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A - Anos

ALT – Alanina aminotransferase.

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais.

CT – Células-tronco

CTM-Células-tronco mesenquimais.

CTDAs – Células-tronco derivadas do tecido adiposo.

CTDAH – Células tronco derivado do tecido adiposo humano.

DPSC - Células-tronco derivadas de polpa dentária

DP – Desvio padrão.

FGF-2 – Fator do crescimento de fibroblastos 2.

HT – Hematócrito.

ISTC - International Society for Cellular Therapy

NCF – Fator de crescimento neuronal.

PVPI – Polivinilpirrolidona.

RM – Ressonância magnética.

SBF – Soro bovino fetal.

SID – *Semel in die*. Do latim significa uma vez ao dia.

SRD – Sem raça definida.

SSMP – Succinato sódico de metilprednisolona.

TC – Tomografia computadorizada.

TID – *Ter in die*. Do latim significa três vezes ao dia.

UTSI – Unidade de terapia semi intensiva.

VEGF - Fator do crescimento do endotélio vascular.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Objetivo geral.....	8
1.2 Objetivos específicos.....	8
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
2 Avaliação sensitiva e motora de cães com lesão medular aguda, submetidos à decompressão cirúrgica e transplantes de células-tronco mesenquimais.....	11
2.1 Sensitive and motor evaluation of dogs with acute spinal cord injury, submitted to surgical decompression and transplantation of mesenchymal stem cell.....	12
2.2 INTRODUÇÃO.....	14
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.3.1 Critérios de inclusão.....	17
2.3.2 Grupos .....	17
2.3.3 Avaliação locomotora e sensitiva.....	18
2.3.4 Isolamento e cultivo das CTDA.....	18
2.3.5 Congelamento e descongelamento das CTDA.....	19
2.3.6 Caracterização das CTDA.....	19
2.3.7 Procedimentos anestésico e cirúrgico .....	20
2.3.8 Aplicação das CTDA.....	21
2.3.9 Período pós-operatório .....	21
2.3.10 Critérios para alta hospitalar.....	22
2.3.11 Análise estatística .....	22
2.4 Resultados e Discussão.....	23
2.5 Conclusão .....	32
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
4 ANEXOS.....	38

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, ao meu pai Leonel Swiech Bach e minha mãe Ivone Terezinha Alves da Cruz Bach, por demonstrarem através de exemplos a importância da honestidade e por não medirem esforços para providenciar uma boa educação, agradeço a minha noiva Gabriela Marin van der Broocke Campos por sua parceria, estando do meu lado de forma incentivadora.

Agradeço a todos do Hospital Veterinário Clinivet em especial ao Dr. Marcelus Natal Sanson, pelo apoio e incentivo, agradeço também a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) pela isenção e pela oportunidade do mestrado, ao meu orientador José Ademar Villanova Junior pela disponibilidade, amizade há mais de 15 anos e ensinamentos, aos profissionais do Núcleo de Terapia Celular da PUCPR, especialmente à Dra. Carmen Kuniyoshi Rebelatto, Leticia Fracaro e Felipe Yukio Ishikawa Fragoso que por 11 vezes, estavam no laboratório às 5 horas da manhã, para que eu às 7h30 estivesse iniciando os procedimentos cirúrgicos com as células-tronco disponíveis, aos professores Fabiano Montiani Ferreira e Alexandra Cristina Senegaglia pela participação na qualificação do mestrado, aos clientes por tomarem a decisão correta e não medirem esforços para o bem do seu animal de estimação e um agradecimento especial aos pacientes, os quais sem eles esta dissertação não seria possível. Humildemente sinto orgulho de fazer parte da equipe que ajudou estes cães retornarem a andar.

## RESUMO

Paraparesia e paraplegia são sinais clínicos comuns em cães, sendo que a principal causa é a hérnia discal, que promove compressão da medula espinhal. Esta é considerada emergência neurológica. Não existe terapia farmacológica eficaz para a lesão medular primária e a terapia farmacológica para lesão medular secundária é questionável quanto a sua eficácia. Quando há compressão medular evidente na mielografia, tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética a descompressão cirúrgica o mais breve possível é indicada. Apesar de diversas terapias medicamentosas ou celulares bem-sucedidas ainda não foi observado a recuperação total das lesões do parênquima medular lesionado. O transplante de células-tronco tem sido considerado opção promissora para o tratamento de distúrbios neurológicos, incluindo lesões medulares agudas e crônicas, devido seu efeito anti-inflamatório, potencial angiogênico, ação parácrina e eventual transformação neuronal. Este estudo tem como objetivo avaliar 22 cães com paraplegia aguda, devido a hérnia discal toracolombar, nos graus IV e V e os efeitos da descompressão cirúrgica associada ou não ao transplante de células-tronco mesenquimais (CTMs) de forma epidural no momento da cirurgia.

**Palavras Chaves:** neurocirurgia, terapia celular, paraplegia, paraparesia, cães.

## ABSTRACT

Paraparesis and paraplegia are common in dogs. The main cause is herniated disc, which promotes compression of the spinal cord and is considered a neurological emergency. There is no effective pharmacological therapy for primary spinal cord injury and pharmacological therapy for secondary spinal cord injury is questionable regarding its efficacy. When there is evident spinal compression in myelography, computed tomography and/or magnetic resonance image, surgical decompression as soon as possible is indicated. Despite several successful drug or cellular therapies, full recovery of lesions of the injured medullary parenchyma has not yet been observed. Stem cell transplantation has been considered a promising option for the treatment of neurological disorders, including acute and chronic spinal cord injury because of its anti-inflammatory effect, angiogenic potential, paracrine action and eventual neuronal transformation. This study aims to evaluate dogs with acute paraplegia due to thoracolumbar disc herniation in degrees IV and V and the effects of surgical decompression associated or not to the transplantation of mesenchymal stem cell (MSC) in an epidural manner at the time of surgery.

Key words: Neurosurgery, cell therapy, paraplegia, paraparesis, dogs.

## CAPITULO 1

### 1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

Uma das causas mais comuns no atendimento neurológico em animais de companhia é a compressão medular, principalmente nos segmentos toracolombares (T3-L3), tal compressão pode incluir vários sinais clínicos, incluindo: dor, ataxia, perda parcial ou total da motricidade, bexiga neurogênica e perda da nocicepção. As lesões medulares podem ser decorrentes de fatores extrínsecos como atropelamentos, quedas, brigas, chutes ou projéteis balísticos, situações que causam fraturas com consequentes luxações ou subluxações vertebrais, ou podem ser secundárias a fatores intrínsecos como neoplasias, embolismo fibrocartilaginoso ou hérnias discais (Coates, 2013; Dewey e Costa 2016).

Dentre todas as causas de compressão medular, as hérnias discais são as mais frequentes. O termo herniação do disco pode ser caracterizado por um conjunto de fenômenos: 1) Extrusão do núcleo pulposo (Hansen tipo I), 2) Protrusão do anel fibroso (Hansen tipo II), 3) Extrusão aguda não compressiva do núcleo pulposo, quando há contusão medular pela alta velocidade de pequena quantidade de material discal que se choca na medula (Hansen tipo III), 4) Hérnia intervertebral (nódulo de Schmorl), quando ocorre degeneração da extremidade cranial ou caudal do corpo vertebral em conjunto com o disco intervertebral, e ambos vem a comprimir a medula, condição rara em quadrúpedes, e 5) Hérnia sequestrada (presença de material anular ou nuclear herniado que não é mais contíguo com o disco) (Mankin e Franck 2015).

Existem diferenças de origem e de desenvolvimento das lesões compressivas súbitas comumente associadas à extrusão do núcleo pulposo, e lesões compressivas de lenta progressão, usualmente protrusões do anel fibroso, que se traduzem em alterações de natureza distintas no parênquima medular, implicando diferentes estratégias terapêuticas (Coates, 2013).

A extensão do dano mecânico primário varia amplamente em significado, ocorrendo desde a ruptura completa da medula espinhal em fraturas vertebrais

deslocadas até a lesão mínima em certas herniações discais (Toombs e Waters, 2007). Os déficits neurológicos em consequência da lesão aguda da medula espinhal podem resultar de contusão mecânica (lesão primária) das vias neuronais imediatamente após o trauma, assim como de lesão tecidual tardia (secundária) que ocorre em um período de minutos a dias após a primária. Essas lesões tardias relacionam-se ao desencadeamento de cascata de eventos destrutivos sistêmicos, locais, celulares, que promovem isquemia, hipóxia, edema e diversos eventos bioquímicos prejudiciais à medula espinhal (Osako et al., 2008).

Tais lesões podem atingir todas as regiões medulares, e dependendo da localização, produzirão sinais clínicos e neurológicos específicos. A gravidade da lesão medular secundária a hérnia discal, depende da velocidade e impacto inicial, bem como a quantidade de material herniado e o tempo de compressão medular (Dewey e Costa, 2016).

As hérnias discais graves em cães podem causar perdas motoras e sensitivas, alterações no funcionamento do sistema urinário, além de comprometimento intestinal, respiratório, circulatório e reprodutivo, dependendo da localização da lesão medular (Lianza et al., 2001; Park et al., 2012). Cerca de 10% dos pacientes com lesões medulares toracolombares graves podem desenvolver mielomalácia, que refere a liquefação da medula, secundária a alterações, vasculares, inflamatórias e bioquímicas que evoluem para isquemia e necrose. Tal alteração liquefativa é um dos piores cenários para lesão medular (Coates, 2013).

As disfunções do trato urinário inferior, como a hiperatividade da bexiga urinária secundária a hiperatividade do detrusor e dissinergia vesico-esfincteriana secundária a constrição do esfíncter interno, ocorrem devido ao envolvimento do nervo hipogástrico, que emerge nos segmentos medulares de L1 a L4 em cães e é o responsável pelo relaxamento do detrusor e contração do esfíncter uretral interno. As lesões medulares que danificam os neurônios motores superiores (T3-L3), mas deixam o segmento lombossacral (L4-S3) intacto resultam em bexiga hiperativa e o animal ficará incontinente por hiperdistensão vesical e gotejamento urinário, sendo difícil a compressão manual. A bexiga hipoativa ou atônica ocorre quando a lesão medular atinge o segmento lombossacro (L4-S3) e afetam o nervo pélvico, que

emerge dos segmentos medulares S1 a S3, ocasionando atonia do detrusor. Nestes casos, os impulsos nervosos dos receptores de estiramento na parede da bexiga não resultam na micção reflexa, levando a distensão da bexiga, entretanto é de fácil esvaziamento vesical por massagem manual porque não há aumento do tónus esfinteriano (Hu et al., 2016).

As infecções do trato urinário são comuns em lesões de neurônios motores superiores da região toracolombar (T3-L3), ou em lesões de neurônios motores inferiores da região lombossacra (L4-S3) da medula espinhal. É sabido que pacientes com lesões medulares graves (Grau V) podem ter recuperação locomotora em três ou mais meses e o retorno da função urinária próxima do normal pode também levar este período, recentes estudos sugerem que a neuroplasticidade da hiperatividade do detrusor pode durar este período em alguns cães (Hu et al., 2016).

Existem várias classificações na literatura veterinária na tentativa de determinar a gravidade da lesão medular, por meio de sinais neurológicos e consequente melhor opção terapêutica. Uma das formas de classificação mais usadas é a proposta por Scott e Mckee (1999) que varia do grau I ao V e se refere a lesões toracolombares. Grau I: apenas dor (discogênica e na musculatura epaxial); Grau II: ataxia e déficit leve de propriocepção nos membros pélvicos; Grau III: paraparesia; Grau IV: paraplegia e incontinência urinária por retenção e Grau V: paraplegia, incontinência urinária por retenção e ausência de dor profunda nos membros pélvicos. Tal classificação em graus é de fundamental importância para decisão do melhor tratamento, sendo que existe concordância entre a maioria dos autores (Tabela 1) que pacientes acima do grau II, necessitam de diagnóstico obtido por mielografia, tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética e caso exista compressão medular por material discal é indicada a descompressão cirúrgica. Há correlação direta entre o grau de comprometimento no exame neurológico dos pacientes com lesão toracolombar e a recuperação funcional dos pacientes, ou seja, quanto maior o grau de lesão neurológica, menor a eficácia terapêutica, seja ela conservadora, cirúrgica ou associada. Quanto mais precoce o diagnóstico, utilizando meios de imagem como mielografia, tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética com eventual intervenção cirúrgica,

menor será a lesão secundária decorrente da compressão medular, o que influenciará diretamente no prognóstico do paciente (Sharp e Wheeler 2005; Coates, 2013).

Quadro 1 - Índices de recuperação e de recorrência dos sinais em cães com diferentes graus de lesão neurológica toracolombar quando submetidos aos tratamentos conservador ou cirúrgico. Fonte: Coates R.J in BSAVA - The British Small Animal Veterinary Association (2013).

ESTÁGIO NEUROLÓGICO	ÍNDICES DE RECUPERAÇÃO	
	TRATAMENTO CONSERVADOR	TRATAMENTO CIRÚRGICO
Apenas dor, ataxia , paraparesia (Graus 1,2,3)	75 a 85% (Funquist, 1978, Davies and Sharp, 1983) 55% (Levine et al 2007)	96%(Sukhiani 1996, Forterre et al 2008)
Paraplegia com dor superficial (Grau 4)	51% (Funquist, 1970)	91% (Brisson et al 2004)
Paraplegia com dor profunda (Grau 4)	50% (Davies, 1983)	86% (Ferreira, 2002)
Ausência de dor profunda <12 horas (Grau 5)	5-10% (Davies, 1983)	58% (Olby et al., 2003)
Ausência de dor profunda > 48 horas (Grau 5)	5-10% (Davies, 1983)	33% (Scott and Mckee,1999) 6,7% (Loughin et al., 2005)
RECORRÊNCIA	50% (Mann,2007)	7,5% (Brisson 2011)

Os corticoides são amplamente utilizados em medicina veterinária, no tratamento conservador de pacientes com hérnia discal, sejam eles apresentados apenas com dor local ou com déficit neurológico significativo, embora seu uso ainda seja muito controverso, muitas vezes é prescrito, baseado no fato que comumente é utilizado corticoide para hérnia discal, sem se valer do potencial de seus efeitos colaterais (Mankin e Franck, 2015).

Um dos efeitos da lesão medular aguda por material discal é a menor circulação de sangue no local, com posterior formação de radicais livres que causam dano medular devido ao processo de peroxidação lipídica e um dos potenciais efeitos dos corticoides é ter ação inibitória na peroxidação lipídica (Mankin e Franck, 2015).

Outra função dos corticoides é sua eficácia em reduzir a inflamação e o

edema vasogênico. Embora a utilização de corticoides pode aumentar o risco de efeitos colaterais como pneumonia, perfuração gastrintestinal, êmese, sepse e morte (Mankin e Franck, 2015 ).

Em um recente estudo (Olby et al. 2016) comparando a utilização do succinato de metilprednisona, polietilenoglicol e placebo em cães com hérnias discais toracolombares e ausência de dor profunda (grau V), no período pré e pós-operatório, observou que a utilização destes fármacos não influenciou de forma positiva na recuperação em nenhum dos pacientes.

Na medicina veterinária observa-se concordância entre a maioria dos autores que mediante a utilização de corticoides em extrusão discais, existe a necessidade de confinamento do paciente, para que não ocorra piora do quadro neurológico devido a excesso de movimentação (Sharp e Wheeler, 2005).

Vários autores relatam que o uso de anti-inflamatórios esteroidais (corticoides) e anti-inflamatórios não esteroides (carprofen, meloxicam, entre outros) em conjunto é contraindicado devido aos significativos efeitos contralaterais gastrintestinais observados (Coates, 2013; Dewey e Costa, 2015).

Villanova Jr. (2013) fez aplicação de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh) associadas ou não à aplicação de succinato sódico de metilprednisolona (SSMP) em ratos Wistar com lesão medular compressiva, e concluiu que o uso da utilização das CTDAh contribui positivamente na melhora da funcionalidade locomotora e da micção. Neste estudo a associação das CTDAh ao corticoide não demonstrou ser um tratamento mais eficiente comparado ao transplante isolado de CTDAh.

Alguns autores, já previam o uso de células-tronco (CT) em neuropatas, pois diferentes estudos revelavam ações parácrinas de angiogênese, neurogênese e sinaptogênese pós-transplantes de CT (Chopp e Li, 2002; Qu et al., 2008).

Diversas pesquisas em lesões medulares vêm explorando o potencial da terapia celular, utilizando o transplante de células-tronco adultas em lesões medulares agudas, com resultados promissores, uma vez que existe ação anti-inflamatória, parácrina e angiogênica no local da aplicação. (Park et al., 2010; Penha et al., 2014) e crônicas (Sarmiento et al., 2014).

Apesar do significativo número de estudos já realizados com células-tronco em animais com lesão medular, há dificuldade na comparação direta destes trabalhos, a variação no número de células transplantadas, nos modelos animais e variação do tempo entre a ocorrência da lesão e o tratamento (Barnabé 2008; McMahon et al., 2014).

### 1.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar neurologicamente cães paraplégicos, graus IV e V, com hérnia discal toracolombar aguda, diagnosticados com tomografia computadorizada, submetidos a descompressão cirúrgica com e sem o transplante de células-tronco derivadas do tecido adiposo.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Avaliar a recuperação motora e sensitiva nos dois grupos de tratamento.

Comparar o tempo de recuperação dos animais, após os diferentes tratamentos utilizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Barnabe F.H. e Frise J. 2008 Stem Cells for Spinal Cord Repair. Cell Stem Cell. Pag. 16-24.
- 2) Brigitte A. Brisson, Shannon L. Moffatt, Seanna L. Swayne, Joane M. Parent. 2004. Recurrence of thoracolumbar intervertebral disk extrusion in chondrodystrophic dogs after surgical decompression with or without prophylactic fenestration: 265 cases. JAVMA, Vol 224, No. 11.
- 3) Chopp M, Li Y. 2002 Treatment of neural injury with marrow stromal cells. Lancet Neurology. Pag. 92-100.
- 4) Coates R.J. in Olby N. and Platt S. 2013 Manual of Canine and Feline Neurology, 4 Edição. British Small animal veterinary Association (BSAVA). Cap 16. Pag 297-327.
- 5) Dewey C.W., Da Costa R. C. 2016. Practical Guide to Canine and Feline Neurology, 3ª Edição. Wiley Blacwell. 331-340.
- 6) Franck Forterre , Martin Konar, David Spreng, Andre Jaggy, Johann Lang - 2008 - Influence of Intervertebral Disc Fenestration at the Herniation Site in Association with Hemilaminectomy on Recurrence in Chondrodystrophic Dogs with Thoracolumbar Disc Disease: A Prospective MRI Study. Veterinary Surgery 37:399–405.
- 7) Hu H.Z., Granger N. and Jeffery N.D. 2016 Pathophysiology, Clinical Importance, and Management of Neurogenic Lower Urinary Tract Dysfunction Caused by Suprasacral Spinal Cord Injury J Vet Intern Med. Cap. 23. Pag. 1-14.
- 8) Lianza S.; Casalis M. E.; Greve J.M.D.; Eichberg R. 2001 A lesão medular. In: Medicina de Reabilitação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 9) Mankin J.M and Franck F. 2015 in Fingerroth J; Thomas W. 2015 Advances In: Intervertebral Disc Disease in dogs and Cats. Wiley Blackwell. Cap. 23. Pag 181-186.

- 10) McMahill B.G. , Borjesson D. L. , Blum M.S. , Nolte J.A , Sturges B. K 2014 Stem Cells in Canine Spinal Cord Injury – Promise for Regenerative Therapy in a Large Animal Model of Human Disease Stem Cell Rev and Rep. Pag 1-14.
- 11) Olby N.J., A.C. Muguet-Chanoit, J.-H. Lim, M. Davidian, C.L. Mariani, A.C. Freeman, S.R. Platt, J. Humphrey, M. Kent, C. Giovanella, R. Longshore, P.J. Early, and K.R. Munana 2016 A Placebo-Controlled, Prospective, Randomized Clinical Trial of Polyethylene Glycol and Methylprednisolone Sodium Succinate in Dogs with Intervertebral Disk Herniation. J Vet Intern Med. Pag. 206-214.
- 12) Osako O.F.S.U.; Akamine C., Santos M. M. 2008 Emergências Neurológicas Emergências e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais. São Paulo: Roca. Pag. 160-178.
- 13) Park E.H., White G.A. Tieber, L.M. 2012 Mechanisms of injury and emergency care of acute spinal cord injury in dogs and cats. Journal Veterinary Emergency and Critical Care. Pag. 160-178.
- 14) Park W. B.; Kim S.Y.; Lee, S.H.; Kim, H.; Park, J.; Hyun, J. K. 2010 The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats. BioMed Central Neuroscience. Pag. 1-11.
- 15) Penha E.M, Meira C.S, Guimarães E.T., Mendonça M.V.P. 2014 Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow for the Treatment of Naturally Injured Spinal Cord in Dogs. Stem Cells International. Pag. 1-8.
- 16) Qu C, Mahmood A, Lu D, Goussev A, Xiong Y, Chopp M. 2008 Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells. Brain Research. Pag. 234-239.
- 17) Sarmiento C.A.P., Rodrigues M.N. , Bocabello R.Z. , Mess A.M., Miglino M.A. 2014 Pilot study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. Regenerative Medicine Research. Pag. 1-6.
- 18) Scott H. W.; Mckee W. M. 1999 Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. Journal of Small Animal Practice. Pag. 417-422.

- 19) Sharp N.J.H.; Wheeler S. J. 2005 Small Animal Spinal Disorders Diagnosis and Surgery. 2ª Edição. Elsevier. Cap. 8 Pag. 121-159.
- 20) Sukhiani HR, Parent JM, Atilola MA, Holmberg DL. Intervertebral disk disease in dogs with signs of back pain alone: 25 cases. J Am Vet Med Assoc. 1996 Oct 1;209(7):1275-9.
- 21) Tombs J. P.; Waters, D. J. 2009 Afecção do Disco Intervertebral. In: Slater, D. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. 3.ed. São Paulo: Manole.

## **CAPÍTULO 2**

### **Avaliação sensitiva e motora em cães com extrusão do disco intervertebral toracolombar, submetidos a descompressão cirúrgica e transplante de células-tronco mesenquimais.**

#### **RESUMO**

Paraparesia e paraplegia são comuns no atendimento de cães, a principal causa é a hérnia discal, que é considerada uma emergência neurológica. Não existe terapia farmacológica eficaz para a lesão medular primária e a terapia farmacológica para lesão medular secundária é questionável quanto a sua eficácia. Quando há compressão medular evidente na mielografia, tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética a descompressão cirúrgica o mais breve possível é indicada. Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da descompressão cirúrgica associada ou não ao transplante alogênico de células-tronco derivadas do tecido adiposo de cães (CTDAs) em cães com paraplegia aguda. Foram avaliados 22 cães adultos de diferentes raças, com paraplegia aguda decorrente de hérnia discal do tipo I de Hansen (1952) na região toracolombar (T3-L3), comprovada por tomografia computadorizada. Todos os animais apresentavam lesões nos graus IV ou V, conforme escala de Scott e Mckee (1999). Todos os 22 animais foram submetidos a cirurgia, no máximo sete dias após o início dos sinais clínicos. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em dois grupos, grupo I (descompressão): 11 animais, submetidos à hemilaminectomia e remoção do material discal compressor e grupo II (descompressão e CTDAs): 11 animais, submetidos ao mesmo procedimento do grupo I e administração de  $10^7$  de CTDAs de forma epidural na região da lesão logo após a descompressão cirúrgica. Além da avaliação pré-operatória, os pacientes foram avaliados diariamente até alta do internamento, e nos dias sete, 14, 28 e 60 de pós-operatório. Os resultados observados foram: média de idade de 6,9 ( $\pm 1,44$ ) anos para os animais pertencentes ao grupo I, e média de idade de 6,2 ( $\pm 3,06$ ) anos para os pertencentes ao grupo II. Em nosso

estudo todos os animais que apresentavam grau IV, em ambos os grupos (com ou sem CTDA) recuperaram a locomoção, porém a mediana para recuperação da locomoção foi de 7 dias para os pacientes do grupo II, enquanto que para o grupo I a mediana foi de 21 dias, havendo diferença estatística significativa Mann Whitney ( $P < 0,05$ ) entre os grupos. Também foi encontrada diferença estatística ( $P < 0,05$ ) no tempo de internamento pós descompressão cirúrgica, animais do grupo II tiveram a mediana de 3 dias, enquanto nos animais do grupo I a mediana foi de 4 dias. Entretanto não houve diferença com significância estatística no número de animais que recuperaram a locomoção e a nocicepção nos diferentes grupos. Como conclusão o uso de CTDA por via epidural pode contribuir de forma positiva para a melhora motora de cães com paraplegia aguda, pois foram constatados menores tempos para retorno da locomoção e de internamento quando comparado à descompressão cirúrgica isoladamente.

**Palavras Chaves:** neurocirurgia, terapia celular, paraplegia, paraparesia, cães.

### ***2.1 Sensitive and motor evaluation of dogs with acute spinal cord injury, submitted to surgical decompression and transplantation of mesenchymal stem cells***

#### **ABSTRACT**

Paraparesis and paraplegia are common in dogs, the most main cause is herniated disc disease, which is considered a neurological emergency. There is no effective pharmacological therapy for primary spinal cord injury, and pharmacological therapy for secondary spinal cord injury is questionable. When there is evident spinal compression in myelography, computed tomography and/or magnetic resonance imaging, surgical decompression as soon as possible is indicated. This study aims to evaluate the effects of surgical decompression associated or not to allogeneic transplantation of canine adipose derived stem cell (ADSCs) in dogs with acute

paraplegia. Twenty two adult dogs of different breeds, with acute paraplegia resulting from Hansen (1952) type I disc herniation in the thoracolumbar region (T3-L3) were evaluated by computed tomography. All animals presented lesions in grades IV or V, according to Scott and Mckee (1999) scale. All 22 animals underwent surgery no later than seven days after the onset of clinical signs. The patients were randomly divided into two groups: group I (decompression): 11 animals, submitted to hemilaminectomy and removal of the disc material and group II (decompression and ADSCs ) 11 animals, submitted to the same procedure as group I and administration of  $10^7$  epidural MSC on the lesion at the time of surgical decompression. In addition to the preoperative evaluation, the patients were evaluated daily until hospital discharge, and on postoperative days 7, 14, 28 and 60. The observed results were: mean age of 6.9 ( $\pm$  1.44) years for the animals belonging to group I, and mean age of 6.2 ( $\pm$  3.06) years for those belonging to group II In our study, all animals with grade IV in both groups (with or without CTDA) recovered locomotion, but the median for locomotion recovery was 7 days for group II patients, while for group I a Median was 21 days, with a statistically significant Mann Whitney difference ( $P < 0.05$ ) between the groups. There was also a statistical difference ( $P < 0.05$ ) in the time of hospitalization after surgical decompression, animals of group II had a median of 3 days, while in the animals of group I the median was 4 days. However, there was no statistically significant difference between groups about number of animals that recovered the locomotion and recovery the nociception. As conclusion, the use of epidural mesenchymal stem cells may contribute positively to the motor improvement of dogs with acute paraplegia, as they were found to have shorter times for return of locomotion and hospitalization when compared to surgical decompression alone.

**Index terms:** Neurosurgery, cell therapy, paraplegia, paraparesis, dogs.

## 2.2.INTRODUÇÃO

Uma das principais causas de atendimento neurológico em animais de companhia é a compressão medular, principalmente nos segmentos toracolombares (T3-L3), resultando em dor, ataxia, perda parcial ou total da motricidade, bexiga neurogênica e perda da nocicepção (Coates, 2013; Dewey e Costa 2016). A lesão medular primária é a que ocorre no momento do traumatismo, e varia desde a ruptura completa da medula espinhal em fraturas vertebrais deslocadas até a lesão mínima em certas herniações discais (Toombs e Waters, 2007). As lesões tardias ou secundárias podem ocorrer em horas a dias após a lesão primária, relacionam-se ao desencadeamento de cascata de eventos destrutivos sistêmicos, locais, celulares, que promovem isquemia, hipóxia, edema e diversos eventos bioquímicos prejudiciais à medula espinhal (Osako et al., 2008).

Existem várias classificações na literatura veterinária na tentativa de determinar a gravidade da lesão medular, uma das mais usadas é a proposta por Scott e Mckee (1999), Sharp e Wheeler (2005). A maioria dos autores concordam que pacientes com graus III, IV e V, devem ser submetidos a exames de imagens como a mielografia, tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética e caso visualizado hérnia discal e compressão medular, os pacientes devem ser submetidos à procedimento cirúrgico descompressivo.

A utilização de corticoides não substitui a descompressão cirúrgica, porém seu uso é amplamente utilizado e discutido na medicina humana e veterinária. Um dos efeitos da lesão medular aguda por material discal é a menor circulação de sangue no local, com posterior formação de radicais livres, esses radicais livres causam dano na medula devido ao processo de peroxidação lipídica, um dos potenciais efeitos dos corticoides é ter ação inibitória na peroxidação lipídica, sendo que o succinato sódico de metilprednisolona (SSMP) tem maior efeito na inibição da peroxidação lipídica que a dexametasona (Mankin e Franck 2015). Outra função dos corticoides é sua eficácia em reduzir a inflamação e o edema vasogênico. A utilização de corticoides pode aumentar o risco de efeitos colaterais com pneumonia, perfuração gastrointestinal, êmese, sepse e morte (Mankin e Franck,

2015). De acordo com Park et al. (2012), a terapia para minimizar os danos secundários da lesão medular em medicina veterinária continua a ser controversa, especialmente no que diz respeito à utilização do succinato sódico de metilprednisolona (SSMP).

A utilização de células-tronco adultas como as de medula óssea e as do tecido adiposo, oferece fonte renovável de células que auxiliam na reparação de danos ocorridos por diversas doenças ou lesões (Fossum e Schulz, 2013), incluindo lesões medulares agudas (Macmahill et al., 2014; Penha et al., 2014) e crônicas (Sarmiento et al., 2014).

As células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTDAs) apresentam baixa imunogenicidade mesmo sendo alogênicas e possuem o potencial de diferenciação em outros tipos celulares, e, por meio da ação parácrina, liberam fatores que estimulam as células-tronco do próprio tecido a recuperar a área danificada e possuem ação imunomoduladora sobre as células do sistema imunológico. Devido a estas características, as CTDAs são consideradas alternativas promissoras para o tratamento de pacientes com lesão medular (Fracaro 2014).

Alguns autores, já utilizaram as células-tronco (CT) em neuropatas, pois diferentes estudos revelavam ações parácrinas de angiogênese, neurogênese e sinaptogênese pós-transplantes de CT (Chopp e Li, 2002; Qu et al., 2008). Entretanto, Ramon e Cajal (1928) relataram a dificuldade de regeneração do tecido nervoso. O mecanismo para explicar a regeneração do tecido nervoso na lesão medular não é completamente compreendido devido a sua complexidade (Bradbury e McMahon 2006; Mankin e Franck, 2015).

Um grande número de estudos tem sido realizados com CT em animais com lesão medular, mas apesar dos resultados serem promissores em animais, as tentativas terapêuticas em humanos apresentam um resultado com pouca melhora clínica (Mackay et al., 2008). Há dificuldade na comparação direta destes trabalhos, devido às diferenças no tipo celular e número de células transplantadas, diferentes modelos animais e a variação do tempo entre a ocorrência da lesão e tratamento (Barnabé et al., 2008; McMahon et al., 2014).

A presente dissertação de mestrado tem como objetivo avaliar a eficácia das células-tronco alogênicas derivadas de tecido adiposo como adjuvante no tratamento de cães com lesão medular aguda, secundária hérnia discal (extrusão), entre os segmentos T3-L3, graus IV e V, submetidos à descompressão cirúrgica por hemilaminectomia.

## **2.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.3.1 Critérios de inclusão.**

A dissertação teve o protocolo de aprovação da comissão de ética em uso animal (CEUA): 0998 (Anexo A).

Cães adultos, sem restrição de idade ou sexo, provenientes da rotina do serviço de neurologia do Hospital Veterinário Clinivet (Curitiba-PR, Brasil), com lesão medular aguda toracolombar secundária a hérnia discal do tipo I de Hansen, comprovada por tomografia computadorizada. Os animais deviam apresentar os graus IV ou V de lesão neurológica conforme Scott and Mckee (1999), e valores normais conforme os de referência citados por Thrall (2015) das seguintes provas sanguíneas: hemograma e provas bioquímicas de glicose, ureia, creatinina e alanina aminotransferase. Nos pacientes com idade superior a sete anos, como exames pré-operatórios foram realizadas análises radiográficas torácicas e avaliação ultrassonográfica abdominal, na tentativa de identificar alguma doença concomitante e que pudesse contribuir para uma má recuperação do paciente.

Os animais deveriam apresentar condições clínicas para serem submetidos pelo mesmo cirurgião à descompressão cirúrgica por hemilaminectomia (até no máximo sete dias do início da paraplegia) e transplantes de células-tronco alogênicas derivadas do tecido adiposo (CTDAs), na terceira a quinta passagem.

### **2.3.2 Grupos**

Os cães foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n = 11/grupo). Grupo I (descompressão cirúrgica): pacientes submetidos apenas a descompressão cirúrgica por hemilaminectomia. Grupo II (descompressão cirúrgica + CTDAs):

pacientes submetidos ao mesmo procedimento do grupo I e transplante de  $10^7$  de CTDA's aplicadas sobre a lesão medular logo após a descompressão cirúrgica.

### 2.3.3 Avaliação locomotora e sensitiva

Em todos os animais foi avaliada a locomoção, em piso áspero, sendo considerada a paraplegia ou grau IV a ausência total da atividade motora nos membros pélvicos, mesmo com o paciente elevado pela base da cauda. A avaliação sensitiva foi realizada pela presença ou ausência de nocicepção na falange proximal do quarto dedo dos membros pélvicos. Com o auxílio de pinça hemostática não denteada, a falange era comprimida, e para determinar a presença de dor profunda não bastava a retirada do membro (reflexo flexor), era necessária rotação do corpo e vocalização em resposta ao estímulo doloroso. A ausência de dor profunda foi fator determinante para a classificação em grau V de lesão.

### 2.3.4 Isolamento e cultivo das CTDA's

O tecido adiposo foi obtido de quatro cadelas submetidas à ovariosterectomia eletiva na Unidade Hospitalar de Animais de Companhia da PUCPR. Todas as amostras foram coletadas após o preenchimento do termo de consentimento, que foi enviado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR. As CTDA's foram isoladas utilizando o método de digestão enzimática, conforme Rebelatto et al. (2008). Brevemente o tecido adiposo foi lavado com solução tampão salina fosfatada, (Gibco, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, USA) e a digestão do tecido foi realizada utilizando 1 mg/mL de colagenase tipo I (Gibco, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, USA), durante 30 minutos a 37°C, seguida por filtração com filtro de 100 µm (BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA, USA). A suspensão celular foi centrifugada a 800 g por 10 minutos e os eritrócitos contaminantes foram removidos utilizando um tampão de lise. As células foram lavadas, contadas e plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em meio de cultura DMEM-F12 (Gibco, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, USA), e

antibiótico penicilina 100 unidades/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e estreptomicina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). As células foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e o meio foi trocado duas vezes por semana. Quando as células estavam confluentes, foram dissociadas utilizando tripsina–EDTA 0,25% (Gibco, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, USA) e replaqueadas (Passagem 1).

### 2.3.5 Congelamento e descongelamento das CTDAs.

Após a expansão das células, estas foram criopreservadas. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo. As células foram ressuspensas com SBF e lentamente foi adicionado o meio de congelamento contendo SBF e 20% de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). As células foram transferidas para tubos criogênicos e armazenadas em freezer a -80°C durante 24 horas e transferidas para tanques de nitrogênio líquido.

No dia do transplante, estas células foram descongeladas e foi avaliada a viabilidade celular.

Para o descongelamento, as células foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C e diluídas em meio de cultura DMEM/F12. As células foram centrifugadas por 10 minutos à 400 g e após a centrifugação, foi realizada a contagem e viabilidade das células em câmara de Neubauer. Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o corante azul de tripan.

### 2.3.6 Caracterização das CTDAs

Para a caracterização celular, ou seja, a avaliação das proteínas na superfície das CTDAs de cães, foi realizada a imunofenotipagem por citometria de fluxo. Foram utilizados os anticorpos CD45 FITC, CD44 Alexa fluor 488, CD90 PE, CD29 PE, CD34 PE, CD9 RPE, CD14 APC e CD8a PerCP (Quadro 2).

Quadro 2. Lista de anticorpos de superfície celular utilizados na citometria de fluxo.

Marcador	Reatividade	Clonalidade	Marca
CD45 – FITC	Canídeos	Monoclonal	eBioscience
CD44–Alexa fluor 488	Cão	Monoclonal	AbD Serotec
CD90 – PE	Humanos. Teste em desenvolvimento em cães	Monoclonal	BD Pharmingen
CD29 – PE	Canídeos	Monoclonal	Abcam
CD34 – PE	Canídeos	Monoclonal	eBioscience
CD9 – RPE	Cão	Monoclonal	AbD Serotec
CD14 – APC	Humanos. Teste em desenvolvimento em cães	Monoclonal	BD Pharmingen
CD8a – PerCP	Canídeos	Monoclonal	eBioscience

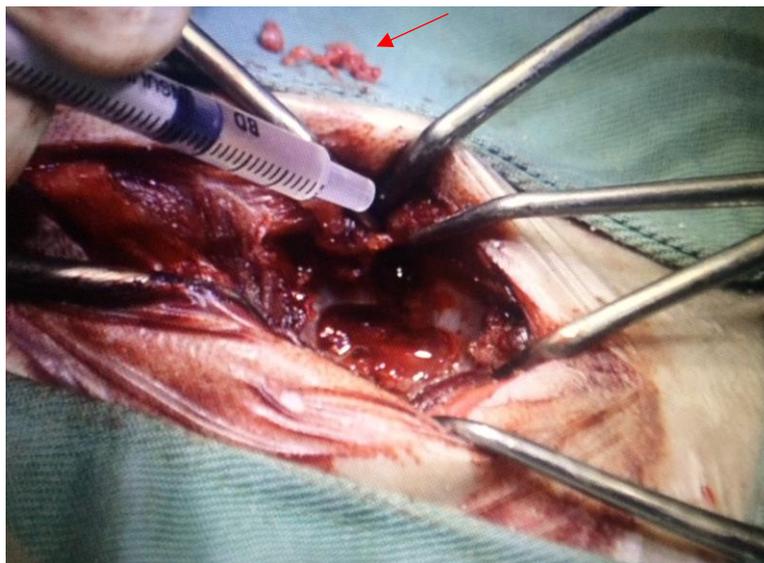
Para a marcação, as células foram lavadas com PBS e incubadas no escuro durante 30 minutos a temperatura ambiente com os anticorpos. Após a incubação as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 500 µL de uma solução contendo 1% de formaldeído (Biotec, labmaster, Paraná, Brasil). Anticorpos isotípicos de camundongo IgG1 foram utilizados como controle (BD Pharmingen, CA, USA). Aproximadamente 100.000 células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) e foram analisadas por meio do *software* FlowJo (Flowjo, Ashland, USA).

### 2.3.7 Procedimentos anestésico e cirúrgico

Como medicação pré-anestésica, foram administrados citrato de fentanila (fentanil) 5 µg/kg e cloridrato de cetamina 1 mg/kg ambos por via intravenosa, seguida de bolus de propofol 5 mg/kg. A manutenção da anestesia foi com o uso do isoflurano por via inalatória e fentanil na dose de 10 µg/kg/h, em infusão contínua intravenosa. Para garantir a assepsia da técnica, em todos os pacientes foi realizada ampla tricotomia na região dorsal, seguida de antissepsia com polivinilpirrolidona (PVPI), colocação de película adesiva incisional (OPSITE™ INCISE) e campo cirúrgico. Com os animais posicionados em decúbito esternal, foi realizado a cirurgia de hemilaminectomia, conforme técnica de Dewey (2013), pelo mesmo cirurgião nos 22 pacientes.

### 2.3.8 Aplicação das CTDAs

Foram transplantadas  $10^7$  CTDAs entre a terceira e a quinta passagens, diluídas em 500  $\mu$ L de meio de cultura no espaço epidural, sobre a lesão medular logo após a descompressão cirúrgica (Figura 2).



**Figura 1** – Transplante das células-tronco alogênicas derivadas do tecido adiposo, logo após retirada do material discal (seta).

### 2.3.9 Período pós-operatório

Os pacientes permaneceram em observação por 48 horas na unidade de terapia semi-intensiva (UTSI), e neste período receberam analgesia por meio de infusão intravenosa contínua de fentanil na dose de 2  $\mu$ g/kg/h. Além disso, foram administrado cloridrato de tramadol e dipirona sódica, por via subcutânea, na dose de 2 mg/kg TID e 30 mg/kg TID respectivamente, durante cinco dias. A antibioticoterapia profilática foi realizada por meio de injeções intramusculares ou intravenosas de enrofloxacina, na dose de 5 mg/kg SID.

Após a permanência na UTSI, os animais foram avaliados diariamente até alta hospitalar (tempo de internamento) e nos dias sete, 14, 28 e 60 dias de pós-operatório.

No momento da alta hospitalar os proprietários receberam orientações sobre repouso, monitorização da função urinária e exercícios leves de fisioterapia.

### 2.3.10 Critérios para alta hospitalar

Para receber alta hospitalar o paciente deveria estar consciente, se alimentando, com capacidade de urinar sem a utilização de sonda urinária, com dor controlada e com cicatriz cirúrgica sem secreções, sendo agendado retorno em sete dias para a primeira reavaliação e retirada dos pontos.

### 2.3.11 Análise estatística

Este foi um estudo prospectivo e os pacientes foram selecionados conforme os critérios de inclusão, de forma aleatória e cronológica (os 11 primeiros pertencem ao Grupo I, enquanto que os demais pertencem ao Grupo II).

As análises referente aos dias para retorno da locomoção dos pacientes e aos dias de internamento, entre os diferentes grupos, foram realizados pelo Teste de Mann-Whitney, gráficos box plot 1 e 2 respectivamente, tal teste foi escolhido devido os dados serem considerados não paramétricos ou seja com distribuição anormal.

Enquanto que a análise referente aos dias para a realização da cirurgia, retorno ou não da locomoção e idade entre os diferentes grupos, foram realizados pelo teste T, por serem considerados dados paramétricos, ou seja, com distribuição normal.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, as células foram provenientes do tecido adiposo por se apresentar uma alta frequência de células-tronco e poder ser facilmente obtida (Fracaro, 2014).

O volume médio de tecido adiposo obtido foi de 65 mL e o número médio de células após o isolamento foi de  $25,75 \times 10^6$  células. As células em cultivo apresentaram uma rápida expansão celular, morfologia fibroblastoide e a média de viabilidade celular antes do transplante foi de 88,31%. A expressão dos antígenos de superfície nas CTDA's foi avaliada por citometria de fluxo e foram obtidos os seguintes resultados: CD29 (99,2%), CD44 (92,9%), CD9 (92,5%), CD8a (41,8%), CD14 (1,39%), CD45 (3,11%), CD34 (5,07%) e CD90 (36,1%) (Figura 2).

Devido a falta de marcadores espécie-específico, não foi possível utilizar todos os anticorpos sugeridos pela International Society for Cellular Therapy (ISCT) para caracterização das CTDA's. Nas CTDA's humanas há uma forte expressão de CD90, porém neste estudo a expressão deste marcador foi de apenas 11,3%, corroborando com os dados de Takemitsu et al. (2012) e Screven et al. (2014). Os dados sugerem que possa haver variabilidade na expressão de marcadores entre as diferentes espécies.

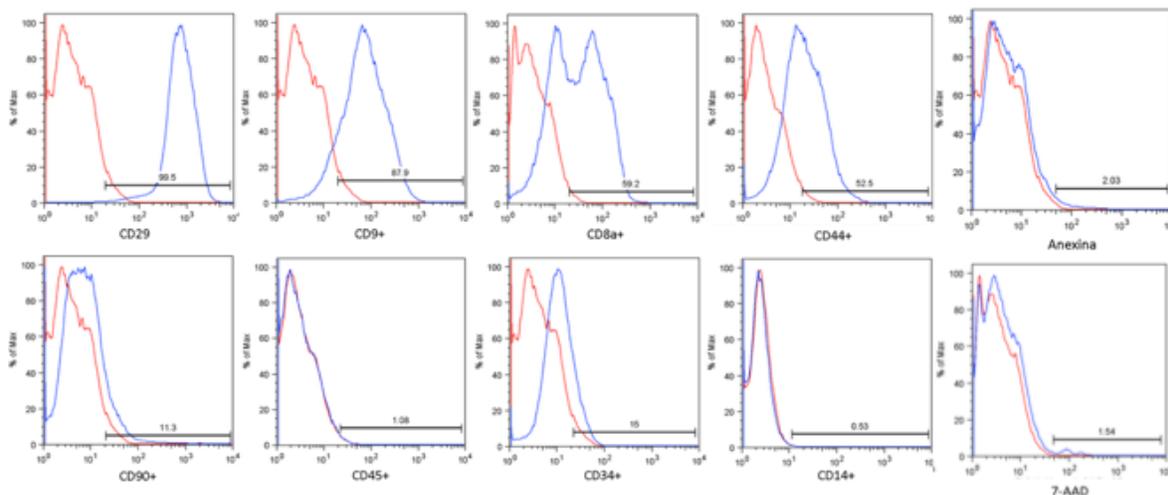


Figura 2. Análise imunofenotípica por citometria de fluxo de uma amostra representativa. Os histogramas azuis indicam a porcentagem da população positiva para cada anticorpo enquanto os histogramas vermelhos indicam o controle isotípico dos anticorpos.

Neste estudo optou-se pelo transplante de forma epidural conforme estudos de Bakshi et al. (2004). Villanova Jr (2013) e Fracaro (2014) utilizando modelo de lesão medular por compressão em ratos Wistar e transplante de CTDA humanas, observaram a sobrevivência e migração destas células para a área lesionada, sendo encontradas inclusive no parênquima medular (Fracaro, 2014). O *homing* das CTDA devido a presença principalmente de citocinas inflamatórias, é de grande importância para a resposta clínica, pois injeções diretamente no tecido da medula espinhal, podem causar danos adicionais (Bakshi et al., 2004, Spaeth et al., 2008).

O grupo I (Tabela 1) foi composto por 11 pacientes, sendo seis machos e cinco fêmeas, destes, quatro eram da raça Dachshund, dois da raça Lhasa Apso, dois Beagles, dois sem raça definida (SRD) e um da raça Cocker Spaniel. Dos 11 pacientes paraplégicos, dois são considerados obesos (11/2) 18% e cinco eram castrados (11/5) 45%. A média de idade foi de 6,9 ( $\pm 1,44$ ) anos. Seis animais eram grau IV e cinco eram grau V, dos animais que possuíam lesão grau IV, todos recuperaram a locomoção, enquanto que apenas um que possuía lesão grau V voltou a andar.

Tabela 1. Raça, idade, grau e local da lesão, tempos para descompressão cirúrgica e recuperação da locomoção, e tempo de internamento dos pacientes submetidos à descompressão cirúrgica.

<b>Animal</b>	<b>Raça e Idade</b>	<b>Grau e Local da Lesão</b>	<b>Tempo para cirurgia e recuperação da locomoção</b>	<b>Dias de internamento</b>
1	Lhasa A. 4 A	IV - T13-L1	7 dias - 27 dias	4 dias
2	Cocker S. 8 A	IV - T13-L1	7 dias- 14 dias	3 dias
3	Srd 7 A	V - L2-L3	2 dias - 28 dias	4 dias
4	Dachshund 5 A	V - L1-L2 e L5- L6	3 dias – Não	5 dias
5	Dachshund 9 A	V - T12-T13	7 dias – Não	5 dias
6	SRD 8 A	IV - T13-L1	3 dias - 14 dias	3 dias
7	Dachshund 8 A	V - T12-T13 e T13-L1	7 dias – Não	5 dias
8	Lhasa 7 A	V- T9-T10 e T10-T11	2 dias – Não	óbito (mielomalácia) 3 dias após
9	Dachshund 6 A	IV - T11-T12	7 dias - 28 dias	4 dias
10	Beagle 7 A	IV - L1-L2	5 dias - 14 dias	4 dias
11	Beagle 7 A	IV - T13-L1	5 dias - 21 dias	5 dias

O grupo II (Tabela 2) foi composto por 11 pacientes, sendo sete machos e quatro fêmeas, destes sete eram da raça Dachshund, três da raça Lhasa Apso e um da raça Buldogue Frânces, dos 11 pacientes paraplégicos, um é considerado obeso (11/1) 9%, dois eram castrados (11/2) 18%. A média de idade foi de 6,2 ( $\pm 3,06$ ) anos. Oito animais eram grau IV e três eram grau V, dos animais que possuíam lesão grau IV, todos recuperaram a locomoção, e nenhum que possuía lesão grau V voltou a andar.

Tabela 2. Raça, idade, grau e local da lesão, tempos para descompressão cirúrgica e recuperação da locomoção, e tempo de internamento dos pacientes submetidos à descompressão cirúrgica e transplante de CTDA's.

<b>Animal</b>	<b>Raça e Idade</b>	<b>Grau e Local da Lesão</b>	<b>Tempo para cirurgia e recuperação da locomoção</b>	<b>Dias de internamento</b>
1	Lhasa A. 6 A	IV - L1-L2	2 dias - 7 dias	3 dias
2	Dachshund 6 A	IV - T10-T11	7 dias - 3 dias	3 dias
3	Lhasa A. 4 A	IV - L2-L3	2 dias - 10 dias	4 dias
4	Dachshund 6 A	IV - L2-L3	2 dias - 7 dias	5 dias
5	Lhasa A. 11 A	IV - T13-L1	7 dias - 28 dias	3 dias
6	Dachshund 6 A	IV - T13-L1	1 dia - 7 dias	3 dias
7	Dachshund 13 A	V - T13-L1	3 dias - Não / Óbito	óbito 2 dias pós cirurgia
8	Buldogue Fr. 3 A	V - L3-L4	3 dias - Não	3 dias
9	Dachshund 6 A	IV - T13-L1	7 dias - 7 dias	2 dias
10	Dachshund 4 A	IV – T12-T13	7 dias - 7 dias	3 dias
11	Dachshund 4 A	V – L2-L3	5 dias - Não	3 dias

Hérnias discais do tipo I de Hansen ocorrem normalmente em raças caninas de pequeno porte, em particular as condrodistróficas, especialmente a raça Dachshund, que é a raça mais afetada. Tal afecção está presente geralmente em animais com mais de dois anos de idade, com o pico da doença entre os três e seis anos de idade, e não há predileção sexual (Dewey e Costa, 2016), dados que corroboram aos observados no presente este estudo, pois todos eram condrodistróficos (considerando que o cão sem raça definida tinha características condrodistróficas) e dos 22 animais avaliados a metade era da raça Dachshund. A média de idade foi pouco superior a seis anos em ambos os grupos e não foi observada predisposição sexual. As principais referências bibliográficas em

neurologia veterinária não citam diferença estatística entre animais obesos, estado reprodutivo e sua relação com hérnia discal, em nosso estudo do total de 22 pacientes apenas três (13%) são obesos e sete (31%) são castrados.

O local com hérnia discal mais comum no presente estudo foi T13-L1 (9/22 pacientes), Dewey e Costa (2016), relatam que os locais mais comuns para hérnia de disco toracolombar em cães de pequeno porte são T12-T13 e T13-L1 e em cães de porte maior são L1-L2 e L2-L3. Todos os pacientes deste estudo eram de pequeno e médio porte, que são mais predispostos a hérnia discal tipo I de Hansen.

A raça Buldogue Francês apresenta menor idade para desenvolvimento de hérnia discal e maior probabilidade de desenvolver mielomalácia se comparada a raça Dashchund, talvez devido ao Bulldog Francês ter mais material no núcleo pulposo e conseqüente maior compressão medular (Takeshi et al., 2012). No Grupo II (descompressão + CTDA) havia um cão da raça Buldogue francês com grau V de lesão, e não apresentou retorno da locomoção durante todo o período de avaliação (180 dias pós descompressão cirúrgica e transplante de células-tronco).

Segundo Sharp e Wheeler 2005 a recuperação da locomoção dos pacientes com grau IV de lesão com o tratamento cirúrgico é de até 90%, enquanto que Olby e Platt (2013) relatam até 85% de melhora nestes pacientes. Nos pacientes grau V ambos autores evidenciam sucesso de aproximadamente 50% dos casos, se operados nas primeiras 48 horas, sendo que a porcentagem diminui para entre sete a 30% se operados após 48 horas. Hu (2016) relatou que cães com ausência de dor profunda operados com menos ou mais de 48 horas, têm resultados semelhantes na recuperação. Em nosso estudo todos os animais que apresentavam grau IV, em ambos os grupos (com ou sem CTDA) recuperaram a locomoção. Nos pacientes grau V, 12,5% (8/1) voltaram a andar, entretanto os demais pacientes, foram acompanhados por apenas 60 dias de pós-operatório, e segundo Sharp e Wheeler (2005) pacientes com grau V podem levar até 250 dias para retorno da locomoção parcial. Ainda segundo Sharp e Wheeler (2005) o número de dias para recuperação em pacientes com o grau neurológico IV é de sete a 28 dias e grau V de 35 a 250 dias, dados estes sem associação com o transplante de células-tronco.

É bem estabelecido que pacientes com lesões medulares graves (grauV) podem ter recuperação na capacidade locomotora em três ou mais meses e o retorno da função urinária normal pode também levar este período, recentes estudos sugerem que a neuroplasticidade da hiperatividade do detrusor pode durar este período em alguns cães (Hu, 2016). Em nosso estudo, todos os pacientes tinham alteração miccional pré cirurgia e permaneciam com cateter urinário nos dois primeiros dias de pós-operatório. Após a retirada do cateter urinário, a maioria conseguia urinar próximo do normal, alguns necessitaram de auxílio com massagem vesical suave, e após os 60 dias de avaliação pós-operatória não foi observado complicações relacionadas à incontinência urinária.

Foi observada diferença com significância estatística ( $p < 0,05$  /  $p 0,01278$ ) no número de dias para os pacientes evoluírem de paraplegia (Grau IV) à paraparesia ambulatorial (Grau II), com a mediana de 7 dias e variação de 3 a 28 dias para os pacientes do grupo II, enquanto que para o grupo I a mediana foi de 21 dias e a variação de 14 a 28 dias (Gráfico1). Também houve diferença significância estatística ( $p < 0,05$  /  $p 0,02088$ ) no tempo de internamento pós descompressão cirúrgica, animais do grupo II tiveram a mediana de 3 dias com variação de 3 a 5 dias, enquanto nos animais do Grupo I a mediana foi de 4 dias e variação de 3 a 5 dias (Gráfico 2). Entretanto, não houve diferença com significância estatística no número de animais que recuperaram a locomoção ( $p \leq 0,071$ ), e nem no número de animais que recuperaram a nocicepção. Também não houve diferença estatística significativa entre grupos, no quesito número de dias para realização da cirurgia e na idade dos pacientes, logo os dois grupos são homogêneos nos dois quesitos supracitados.

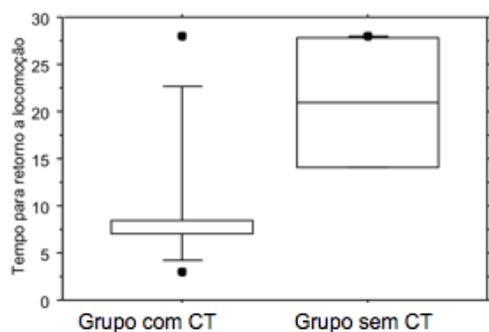


Gráfico 1 – Medianas em dias para recuperação da locomoção nos diferentes grupos

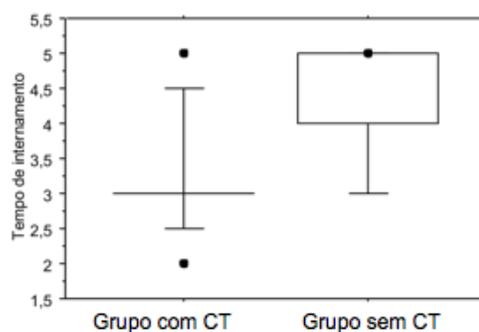


Gráfico 2 – Medianas referentes aos dias de internação pós cirurgia, nos diferentes grupos.

O fato dos transplantes de CTDA terem sido realizados no local da lesão de forma epidural logo após a descompressão cirúrgica e em pacientes com lesão aguda (até no máximo sete dias pós lesão) provavelmente permitiu a ação das CTDA na atenuação da resposta inflamatória; diminuição da imunorreatividade dos astrócitos e ativação de células-tronco endógenas.

Kurozumi et al. (2004), Lu et al. (2005) e Quertainmont et al. (2012), demonstraram que as CTDA são capazes de secretar fatores de crescimento e citocinas, como o fator de crescimento neural (NCF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-10. Os fatores tróficos das CTDA podem ter um efeito benéfico após a lesão espinhal sobre a reparação e reorganização das conexões neuronais, na indução de regeneração, no estímulo a neurogênese, no crescimento axonal, na redução da resposta inflamatória e na proteção do tecido. Todavia tais mecanismos são pouco duradouros, provavelmente durem poucas semanas, e possivelmente não tenham ação sobre lesões crônicas com cicatriz glial já formada.

O período curto entre diagnóstico e tratamento e a presença de citocinas inflamatórias no local da lesão, possibilitaram o *homing* das CTDA para o tecido

neural, permitindo sua ação parácrina, anti-inflamatória e de modulação do ambiente lesionado.

Os dois primeiros pacientes foram transplantados com CTDA's não criopreservadas, à fresco, enquanto os demais pacientes receberam o transplante após a criopreservação e descongelamento das células. Esta mudança na metodologia foi necessária devido a inclusão dos pacientes ter sido mais lenta. Manter as células em cultivo permanentemente, à fresco, para estarem disponíveis para os transplantes, faz com que as células sofram muitas passagens e entrem em senescência, além do custo elevado dos cultivos. Desta forma, optou-se pela criopreservação destas células para serem utilizadas nos demais animais do estudo. Surpreendentemente, o segundo paciente que recebeu células não criopreservadas, teve melhora locomotora em três dias, que foi o melhor resultado observado, entre os grupos.

De acordo com estudos de metanálise com utilização clínica das células-tronco mesenquimais, os melhores resultados foram obtidos com CTMs não criopreservadas (à fresco) e em baixas passagens (pouco tempo de cultivo). Após a criopreservação, as CTMs reduzem sua capacidade imunomoduladora, porém após o descongelamento, se colocadas em cultivo novamente, podem recuperar sua função (Moll et al., 2014).

Alguns estudos avaliaram a imunofenotipagem, a capacidade proliferativa e de diferenciação das CTM antes e após a criopreservação. Yong et al. (2015) demonstraram que estas células mantêm suas características, porém outros estudos mostram que há diferenças no potencial após a criopreservação (James et al., 2011; Shah et al., 2015). As células-tronco após criopreservação, apresentam uma redução na expressão de marcadores hematopoéticos como CD34 e CD45, o que poderia refletir uma diminuição da contaminação com células hematopoéticas (McIntosh et al., 2006; Mitchell et al., 2006).

Em relação ao potencial de diferenciação, há estudos relatando que este efeito não é afetado pela criopreservação e descongelamento das células (Gonzalez-Fernandez et al., 2015), porém outros demonstram que há uma redução nesta capacidade (Shah et al., 2015). Apesar dos resultados conflitantes, as CTMs

após a criopreservação/descongelamento, continuam a apresentar um maior potencial de diferenciação celular comparativamente às células controle não induzidas, mostrando sua utilidade na prática clínica.

Exames histopatológicos foram realizados por Dong (2009) na medula espinal de cães com lesões toracolombares induzidas, e mostraram após cinco semanas, diferenças significativas entre os grupos controle e que receberam células-tronco. Foi observado no grupo células-tronco, a presença de menor volume de mielomálicia e mínimas cavitações intramedulares. Em nosso estudo não foi possível realizar exames histopatológicos, pois os animais foram atendidos em Hospital Veterinário privado. Todos os pacientes, até o presente momento seguem com qualidade de vida, sem sinais de degenerações e pioras do quadro clínico.

A ressonância magnética (RM) é um meio de imagem superior a tomografia computadorizada para avaliação do parênquima medular (Coates, 2013). Como etapas futuras recomenda-se avaliações de RM momentos antes da descompressão cirúrgica e nos períodos pós-operatórios imediato e tardio (cinco semanas) para acompanhamento de imagens do parênquima medular, pois segundo Dong (2009) em cães da raça Beagle com lesões medulares induzidas não houveram diferenças nas imagens da RM na primeira semana entre os grupos controle e células-tronco, porém após cinco semanas, novas imagens foram obtidas e foi constatada diferença significativa entre as imagens. Por RM foram percebidas lesões menores no grupo células-tronco.

Futuramente, usando o mesmo modelo empregado neste estudo, será importante comparar esses resultados utilizando células-tronco de outras fontes, como por exemplo as células-tronco derivadas de polpa dentária (DPSC). Essas células apresentam maior potencial na formação de colônias e proliferação quando comparadas com as CTMs de outras fontes. As DPSC também permanecem mais tempo em cultivo sem apresentar sinais de senescência (Isobe et al 2016). Uma das principais características dessas células é seu elevado potencial de diferenciação neuronal, pois têm origem na ectoderme, mesma origem dos neurônios. Diversos trabalhos já descreveram o potencial das DPSC na diferenciação e expressão de marcadores neuronais (Martens et al., 2013; Tamaki et al, 2013; NAITO et al., 2015).

Essas células já foram utilizadas em estudos com ratos com secção total da medula espinhal, e após o transplante, os animais apresentaram uma melhora maior quando comparados com animais que receberam CTMs da medula óssea (Sakai et al. 2012). Esses resultados demonstram que as DPSC podem ter um futuro promissor quando aplicadas em animais com lesão medular. Além disso, as DPSC de cães já foram caracterizadas e podem ser facilmente isoladas (Dissanayaka et al., 2011; Naito et al., 2015).

Outra possibilidade para estudos futuros nesta área, seria a utilização de biomateriais que poderiam ser colocados juntamente com as células. A utilização de um veículo mais viscoso poderia facilitar a permanência das células no local da injeção por um período maior sem a dispersão para o tecido muscular.

## **2.5 CONCLUSÃO**

Embora não tenha sido observado diferença significativa entre os grupos com relação a locomoção, a associação das CTDA's à descompressão cirúrgica mostrou contribuir positivamente nas reduções de tempo de internamento e dias para o retorno da locomoção. Tal interferência no tempo pode ser atribuída a atenuação da resposta inflamatória, diminuição da imunorreatividade dos astrócitos e ativação de células-tronco endógenas.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Bakshi A., Hunter C., Swanger S., Lepore A., Fisher I. 2004 Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. *J. Neurosurg: Spine*. Pag. 330-337.
- 2) Barnabe F.H. e Frise J. 2008 Stem Cells for Spinal Cord Repair. *Cell Stem Cell*. Pag. 16-24.
- 3) Chopp M, Li Y. 2002 Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurology*. Pag. 92-100.
- 4) Coates R.J. in Olby N. and Platt S. 2013 *Manual of Canine and Feline Neurology*, 4 Edição. British Small animal veterinary Association (BSAVA). Cap 16. Pag. 297-327.
- 5) Dewey C.W., Da Costa R. C. 2016. *Practical Guide to Canine and Feline Neurology*, 3ª Edição. Wiley Blacwell. 331-340.
- 6) Dissanayaka WL, Zhu X, Zhang C, Jin L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J Endod*. 2011;37 (8):1074-1080.
- 7) Dong-In J.; Jeongim H.; Byoung T. K.; Ju-W. K.; 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury.; *Journal of the Neurological Sciences*. Pag. 67-77.
- 8) Fracaro , L. Transplante de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano em ratos Wistar submetidos à lesão de medula espinhal: monitoramento, avaliação da imunomodulação e da expressão de marcadores neuronais. 2014. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
- 9) Gonzalez-Fernandez, M.L., S. Perez-Castrillo, P. Ordas-Fernandez, M.E. Lopez-Gonzalez, B. Colaco, V. Villar-Suarez (2015) Study on viability and chondrogenic differentiation of cryopreserved adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for future use in regenerative medicine. *Cryobiology* 71: 256–263.
- 10) Hu H.Z., Granger N. and Jeffery N.D. 2016 Pathophysiology, Clinical Importance, and Management of Neurogenic Lower Urinary Tract Dysfunction Caused by Suprasacral Spinal Cord Injury *J Vet Intern Med*. Cap. 23. Pag. 1-14.

- 11) Isobe Y, Koyama N, Nakao K, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016;45(1):124-131.
- 12) James, A.W., B. Levi, E.R. Nelson, M. Peng, G.W. Commons, M. Lee, B. Wu, M.T. Longaker (2011) Deleterious effects of freezing on osteogenic differentiation of human adiposederived stromal cells in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev* 20: 427–439.
- 13) Kurozumi, K.; Nakamura, K.; Tamiya, T.; Kobune, M. 2004 gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Molecular Therapy*
- 14) Lianza S.; Casalis M. E.; Greve J.M.D.; Eichberg R. 2001 A lesão medular. In: *Medicina de Reabilitação*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 15) Mackay-Sim A., Cochrane J., Bassingthwaite, Bayliss C. Davies W., Fronck P., Gray G., Kerr G., Licina P. 2008 Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year. *Clinical trial Brain*. 131, Pag. 2376 – 2386.
- 16) Mankin J.M and Franck F. 2015 in Fingerroth J ; Thomas W. 2015 *Advances In Intervertebral Disc Disease in dogs and Cats*. Wiley Blackwell. Cap. 23. Pag 181-186.
- 17) Martens W, Bronckaers A, Politis C, Jacobs R, Lambrichts I. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clin Oral Investig*. 2013;17(9):Pag. 1969-1983.
- 18) McMahon B.G., Borjesson D. L., Blum M.S., Nolte J.A., Sturges B. K 2014 *Stem Cells in Canine Spinal Cord Injury – Promise for Regenerative Therapy in a Large Animal Model of Human Disease* *Stem Cell Rev and Rep*. Pag. 1-14.
- 19) McIntosh, K., S. Zvonic, S. Garrett, J.B. Mitchell, Z.E. Floyd, L. Hammill, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, J.P. Ting, R.W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, J.M. Gimble (2006) The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 24: Pag. 1246–1253.
- 20) Mitchell, J.B., K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z.E. Floyd, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, R.W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, J.M. Gimble (2006)

Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24: 376–385.

21) Moll G, Alm JJ, Davies LC, von Bahr L, Heldring N, Stenbeck-Funke L, Hamad OA, Hinsch R, Ignatowicz L, Locke M, Lönnies H, Lambris JD, Teramura Y, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B, Le Blanc K. 2014. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells*.;32(9):Pag. 2430-2442.

22) Naito E, Kudo D, Sekine S, et al. Characterization of canine dental pulp cells and their neuroregenerative potential. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015;51(10):PAg. 1012-1022.

23) Olby N.J., A.C. Muguët-Chanoit, J.-H. Lim, M. Davidian, C.L. Mariani, A.C. Freeman, S.R. Platt, J. Humphrey, M. Kent, C. Giovanella, R. Longshore, P.J. Early, and K.R. Munana 2016 A Placebo-Controlled, Prospective, Randomized Clinical Trial of Polyethylene Glycol and Methylprednisolone Sodium Succinate in Dogs with Intervertebral Disk Herniation. *J Vet Intern Med*. Pag. 206-214.

24) Osako O.F.S.U.; Akamine C., Santos M. M. 2008 Emergências Neurológicas Emergências e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais. São Paulo: Roca.

25) Penha E.M, Meira C.S, Guimarães E.T., Mendonça M.V.P. 2014 Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow for the Treatment of Naturally Injured Spinal Cord in Dogs. *Stem Cells International*. Pag. 1-8.

26) Qu C, Mahmood A, Lu D, Goussev A, Xiong Y, Chopp M. 2008 Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells. *Brain Research*. Pag. 234-239.

27) Quertainmont R.; Cantinieaux D.; Botman, O 2012 Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. *Plos one*.

28) Rebelato, C.K.; Aguiar, A. M.; Moretão, M. P.; Senegaglia, A.C.; Hansen, P.; Barchiki, F.; Oliveira, J.; Martins, J.; Kuligovski, C.; Mansur, F.; Christofis, A.; Amaral, V. F.; Brofman, P. S.; Goldenberg, S.; Nakao, L. S.; Correa A.; 2008 Dissimilar

differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology and Medicine*.

29) Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest*. 2012; 122(1):Pag. 80-90.

30) Sarmiento C.A.P., Rodrigues M.N., Bocabello R.Z., Mess A.M., Miglino M.A. 2014 Pilot study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. *Regenerative Medicine Research*. Pag. 1-6.

31) Shah F.S.-Li J.-Zanata F.-Curley J.L.-Martin E.C.-Wu X.-Dietrich M.-Devireddy R.V. · Wade J.W. · Gimble J.M. The Relative Functionality of Freshly Isolated and Cryopreserved Human Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *Cells Tissues Organs* 2015–16; 201:Pag. 436–444

32) Scott H. W., Mckee W. M. 1999 Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. *Journal of Small Animal Practice*. Pag. 417-422.

33) Screven R, Kenyon, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, Bigley III EC, Borjesson DL, Zhu M. 2014 Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.161, Pag. 21-31.

34) Sharp N.J.H.and Wheeler S. J. 2005 *Small Animal Spinal Disorders Diagnosis and Surgery*. 2ª Edição. Elsevier. Cap. 8. Pag. 121-159.

35) Spaeth E, Klopp 2008 A: Et all Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Nature*.

36) Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T. 2012 Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Veterinary Research*. v.8, n.150, Pag.1-9.

37) Takeshi A. , Mitshuro S. , Moe S. , Yasushi H. , Masahiro T. 2012 A Comparison of Thoracolumbar Intervertebral Disc Extrusion in French Bulldogs and Dachshunds and Association With Congenital Vertebral Anomalies. *Veterinary Surgery* 43. Pag. 301-307.

38) Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal

stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*. 2013;101(2):  
Pag. 121-132

39) Thrall M. A. 2015 *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, v.1, cap.3 Pag. 80.

40) Tombs J. P.; Waters, D. J. 2009 *Afecção do Disco Intervertebral*. In: Slater, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 3.ed. São Paulo: Manole.

41) Vieira N. M, V. Brandalise, E. Zucconi,\*M. Secco, B. E. Strauss,† and M. Zatz 2010 *Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells Cell Transplantation*, Vol. 19, Pag. 279–289.

42) Villanova Jr. J. A. *Transplante de células-tronco derivadas do tecido adiposo em ratos submetidos à lesão medular compressiva, com e sem tratamento com corticoide*. 2013. 123f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná.

## ANEXO1 - TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Eu, \_\_\_\_\_  
de nacionalidade \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_ anos, estado  
civil \_\_\_\_\_, profissão \_\_\_\_\_, endereço

\_\_\_\_\_ e portador do R.G. \_\_\_\_\_ estou permitindo a participação do meu animal em um estudo denominado **Avaliação Sensitiva e Motora de Cães com Lesão Medular Submetidos ao Transplante de Células-Tronco Mesenquimais**, cujos objetivos e justificativas são: avaliar os efeitos da recuperação da sensibilidade/dor, movimentos e capacidade de urinar de forma controlada após o transplante de células-tronco.

Fui alertado de que meu animal será anestesiado após exames clínicos e laboratoriais (sangue e urina) e nela serão aplicadas células de outro animal, vindas de seu tecido adiposo (gordura).

Retornarei quinzenalmente para novos exames, e terei o suporte da Unidade Hospitalar para Animais de Companhia da PUCPR (41) 3299-4361, caso ocorra alguma complicação.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, estou ciente que meu animal pode ter algum desconforto no pós-operatório da aplicação de células-tronco ou até mesmo não ter resposta ao tratamento.

Estou ciente de que o meu animal será atendido, respeitado e receberá os cuidados necessários, como qualquer outro elemento submetido da mesma forma a procedimentos onde não estejam sendo utilizados para fins de pesquisa.

Também fui informado de que posso recusar a participação do meu animal no estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que recebendo o meu animal.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Thais Gabrielle Ferreira de Sousa Lopes da Silva (PUCPR); José Ademar Villanova Junior (PUCPR); Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto (PUCPR); Letícia Fracaro (PUCPR); Fernando Meyer (PUCPR); Paulo Roberto Slud Brofman (PUCPR) e com eles poderei manter contato pelos telefones **(41) XXXX-XXXX Fernando Bach / (41) XXXX-XXXX José Ademar Villanova Junior.**

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação da pesquisa com o meu animal.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em permitir a participação do mesmo, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação do meu animal.

Curitiba, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome e assinatura do proprietário do animal da pesquisa

Os dados coletados servirão para dissertação de mestrado e serão submetidos a divulgação por meio de congressos e revistas.

## ANEXO 2 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais



Curitiba, 03 de Dezembro de 2015.

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: **0998 – 1ª versão**

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação sensitiva, motora e urodinâmica de cães com lesão medular aguda decorrente de discopatia, submetidos ao transplante de células-tronco mesenquimais

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Ademar Villanova Junior

EQUIPE DE PESQUISA: Carmen Lucia Kunioishi Rebelatto, Fernando Swiech Bach, Paulo Roberto Klaumann, Claudia Turra Pimpão

#### INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

#### ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Medicina Veterinária - Mestrado

VIGÊNCIA DO PROJETO	03/2015 a 02/2017	QUANTIDADE DE ANIMAIS	22
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cães)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M/F	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	2 a 10 anos / 2 a 30kg	ESPECIÉ – GRUPO TAXONÔMICOS (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Clinivet HV	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelos CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR em reunião de **03.12.2015**.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo. Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Marta Luciane Fischer

Coordenadora - Comitê de Ética no Uso de Animais

Marta Luciane Fischer  
Rua Marquês de São Carlos, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil  
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br