

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ALEXANDRA JUSTINO DA SILVA

**APLICAÇÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À LESÃO
RAQUIMEDULAR**

(Intravenous injection of Stem Cells in Rats with Spinal Cord Injury)

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2012**

ALEXANDRA JUSTINO DA SILVA

**APLICAÇÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À LESÃO
RAQUIMEDULAR**

(Intravenous injection of Stem Cells in Rats with Spinal Cord Injury)

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

Orientador: Profa. Dra. Juliany Gomes Quitzan

SÃO JOSE DOS PINHAIS

2012

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

S586a
2012

Silva, Alexandra Justino da
Aplicação intravenosa de células-tronco mesenquimais em ratos Wistar submetidos à lesão raquimedular / Alexandra Justino da Silva ; orientador, Juliany Gomes Quitzan. – 2012.
60 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais, 2012.
Inclui bibliografias

1. Veterinária. 2. Células-tronco. 3. Medula espinhal - Ferimentos e lesões. 4. Bioluminescência. 5. Rato. I. Quitzan, Juliany Gomes. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDD 20. ed. – 636.089

TERMO DE APROVAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus São José dos Pinhais

ATA Nº 0035 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA ALEXANDRA JUSTINO DA SILVA

Aos dezoito dias do mês de dezembro do ano de dois mil e doze, às 08:30 horas, realizou-se no anfiteatro do Mestrado em Ciência Animal da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada na Rodovia 376 – Km 14 – São José dos Pinhais - PR, a sessão pública de defesa da Dissertação da Mestranda Alexandra Justino da Silva, intitulada: "APLICAÇÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À LESÃO RAQUIMEDULAR". A Mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pela Professora orientadora e Presidente da banca, Dra. Juliany Gomes Quitzan, auxiliada pelos Professores Doutores Fernando Meyer (PUCPR) e Ricardo Junqueira Del Carlo (UFV). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada APROVADA.

Profa. Dra. Juliany Gomes Quitzan (Presidente)

Assinatura _____

Prof. Dr. Ricardo Junqueira Del Carlo (UFV)

Assinatura _____

Prof. Dr. Fernando Meyer (PUCPR)

Assinatura _____

Proclamado o resultado, a Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

São José dos Pinhais, 18 de dezembro de 2012.

Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Caroline Nocera Bertton

Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

| SUMÁRIO | Página |
|--|---------------|
| AGRADECIMENTOS..... | ix |
| FORMATO DA DISSERTAÇÃO..... | x |
| RESUMO GERAL..... | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xiii |
| LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS..... | xiv |
| LISTA DE FIGURAS..... | xv |
| CAPÍTULO 1 | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| CAPÍTULO 2 | |
| 2.1 TRAUMA RAQUIMEDULAR..... | 3 |
| 2.2 FISIOPATOLOGIA DO TRAUMA RAQUIMEDULAR..... | 4 |
| 2.3 BEXIGA NEUROGÊNICA..... | 6 |
| 2.4 TRATAMENTO CLÍNICO DA LESÃO RAQUIMEDULAR..... | 8 |
| 2.5 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS..... | 11 |
| 2.6 CELULAS-TRONCO MESENQUIMAIS..... | 12 |
| 2.7 TERAPIA CELULAR E A MEDICINA VETERINÁRIA..... | 14 |
| CAPÍTULO 3 | |
| 3 EFEITOS LOCOMOTORES E MICCIONAIS APÓS | 16 |
| APLICAÇÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS-TRONCO | |
| MESENQUIMAIS EM LESÃO RAQUIMEDULAR | |
| EXPERIMENTAL..... | |
| RESUMO..... | 16 |
| ABSTRACT..... | 17 |
| 3.1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 18 |
| 3.2.1 Animais..... | 18 |
| 3.2.2 Indução do Trauma Raquimedular..... | 19 |
| 3.2.3 Cultivo de Células-tronco Mesenquimais de Tecido | 20 |
| Adiposo Humano..... | |
| 3.2.4 Viabilidade e Caracterização das CTDA..... | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.5 Transplante de Células-tronco Mesenquimais na Veia da Cauda dos Ratos..... | 22 |
| 3.2.6 Análise Neuromuscular dos Membros Pélvicos..... | 22 |
| 3.2.7 Avaliação Pós-transplante das CTDS <i>in vivo</i> | 23 |
| 3.2.8 Avaliação do Padrão Miccional..... | 25 |
| 3.2.9 Eutanásia dos Animais e Colheita de Material para Histologia..... | 25 |
| 3.2.10 Análise Histológica..... | 25 |
| 3.2.11 Análise Estatística..... | 26 |
| 3.3 RESULTADOS | 26 |
| 3.3.1 Mortalidade..... | 26 |
| 3.3.2 Análise Neuromuscular dos Membros Pélvicos..... | 27 |
| 3.3.3 Avaliação Pós-transplante das CTDS <i>in vivo</i> | 27 |
| 3.3.4 Avaliação do Padrão Miccional..... | 30 |
| 3.3.5 Análise Histológica..... | 31 |
| 3.4 DISCUSSÃO..... | 34 |
| 3.5 CONCLUSÃO..... | 39 |
| CAPITULO 4 | |
| 4 CONCLUSÃO GERAL..... | 40 |
| REFERÊNCIAS..... | 41 |
| Anexo A..... | 52 |
| Anexo B..... | 53 |
| Anexo C..... | 54 |
| Anexo D..... | 55 |

Ao meu filho Leonardo, presente de Deus em minha vida!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elza e Lausemar, por me orientarem durante toda vida, sempre indicando os caminhos da honestidade, do compromisso e da responsabilidade. A vocês, meu amor e minha eterna gratidão.

Ao meu amado marido Marcus, por estar ao meu lado, não somente nesta trajetória, mas em todos os maravilhosos momentos de nossa história.

Ao meu filho Leonardo, que mesmo antes de nascer, já me faz a pessoa mais feliz do mundo.

A minha querida irmã Fabiana, pela sua amizade, e por tantas e tantas vezes me auxiliar com os ratinhos.

Ao meu irmão Marcelo e minha sobrinha Lana Mayan, por me perdoarem por todas as ausências que esta caminhada impôs. Querido irmão, meu ídolo.

Ao estimado professor José Ademar Villanova Júnior. Por toda ajuda, ensinamentos e principalmente pela amizade. Posso dizer que mais que um admirável mestre, é um amigo.

A toda equipe do Professor Paulo Roberto Slud Brofman: Leticia Fracaro, Fabiane Barchiki, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, Sérgio Adriane Bezerra de Moura. Perdão aos que deixei de mencionar. Foi um privilégio trabalhar com vocês.

A professora Juliany Gomes Quitzan. Mesmo de longe, obrigada pela preciosa orientação.

Aos funcionários da PUCPR São José dos Pinhais, Carmen Lucia e Seu Elias. Obrigada pela paciência, ajuda e pelos momentos de descontração. Muitas vezes precisávamos.

Aos animais, que há séculos prestam auxílio à ciência, proporcionando um mundo melhor para todos.

Infinitamente obrigada a Deus, por esta oportunidade de aprendizado, e pela vida!

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura. Aborda temas como o trauma raquimedular, sua fisiopatologia, tratamento e o uso de células-tronco como alternativa de terapia celular.

O capítulo 3 é o artigo para publicação em periódicos científicos.

O Capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

A lesão raquimedular (LRM) tem consequências irreversíveis e sua abordagem é desafiadora para a Medicina e Medicina Veterinária. Depois do dano causado à medula espinal, não há restauração da função neurológica no segmento afetado. Os tratamentos incluem estabilização mecânica, descompressão e reabilitação dos pacientes. Um tratamento alternativo é o transplante celular com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDAs). Estas células são facilmente obtidas, de alta capacidade proliferativa, e sua frequência no tecido é de 0,5%. Seu mecanismo de ação não é claro, mas parece que sinalizações parácrinas podem promover a reparação dos tecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de regeneração da lesão medular em ratos submetidos à terapia celular com células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hCTDAs). A lesão da medula espinal dos ratos foi realizada por meio da compressão da região toracolombar (T8 - T9) com um cateter Forgyaty No. 3, mantido durante cinco minutos. O *cuff* do cateter foi insuflado utilizando 80 µL de solução salina. Os animais foram separados em dois grupos de 12 indivíduos cada: grupo A, grupo controle, que recebeu apenas meio de cultura; grupo B foram transplantados com hCTDAs. O transplante foi realizado no sétimo dia e décimo quarto dia após a lesão medular e $1,2 \times 10^6$ células foram injetadas via punção da veia da cauda. A atividade locomotora dos animais foi avaliada usando a escala BBB desenvolvida por Basso et al, 1995. A avaliação locomotora após contusão da medula espinhal foi realizada em campo aberto a cada 15 dias, durante os 90 dias, num total de 6 avaliações. Após três meses da lesão, os animais foram eutanasiados, a medula espinal e a bexiga foram removidos para avaliação histológica com as colorações hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM) (somente para a bexiga). Não houve mudanças nas pontuações para os grupos A e B (score 0 na escala BBB, nenhum movimento dos membros inferiores). Observou-se melhoria clínica na função da bexiga urinária no grupo B, e 83,33% dos animais não apresentavam qualquer retenção / incontinência urinária, em média 8 dias após a segunda aplicação de hCTDAs. A análise histológica da medula não demonstrou diferença significativa entre os grupos A e B. Em relação à avaliação histológica da bexiga, não se observou diferença histológica entre os grupos A e B. Também não se evidenciou diferença entre os grupos em relação à bexiga normal. Foi realizada em dois animais, avaliação quantitativa por meio da bioluminescência, com o objetivo de identificar a localização e intensidade das hCTDAs após as aplicações, *in vivo*. Foi observada maior intensidade de sinal na segunda aplicação de hCTDAs e a localização das células foi identificada no local de aplicação e nos pulmões. Os presentes resultados indicam que o transplante de hCTDAs em ratos com LRM pode ser associado a uma melhora na retenção / incontinência urinária.

Palavras-chave: Células-tronco. Medula espinal. Bioluminescência. Ratos.

ABSTRACT

The spinal cord injury (SCI) has irreversible consequences and its management is challenging for Medicine and Veterinary Medicine. After injury caused to the spinal medulla, there is no restoration of the neurological function in the affected segment. Treatments include mechanical stabilization, decompression and rehabilitation of the patients. An alternative treatment is a cellular transplant with adipose-derived stem cells (ADSCs). These cells are easily obtained, with high proliferative capacity and the frequency in the tissue is 0,5%. Its mechanism of action is not clear, but its accepted that paracrine signs can promote tissue repair. The aim of this study was evaluate the regenerative capacity of spinal cord injury in rats submitted to cell therapy with human adipose-derived stem cells (hADSCs). Spinal cord injuries were performed in rats by compressing the thoracolumbar region (Th8 - Th9) with a catheter Forgaty No. 3 for five minutes. The cuff of the catheter was inflated using 80 μ L of saline solution. The animals were separated in two groups of 12 individuals each: group A, control group, received culture media; group B were transplanted with hADSC. The transplant was performed on the seventh day and fourteenth day after SCI and $1,2 \times 10^6$ cells were injected via puncture of the tail vein. The locomotor activity of the animals was evaluated using a BBB scale developed by Basso et al, 1995. Locomotor activity after spinal cord contusion was analyzed on open field every 15 days during the 90 days, with total of 6 reviews. After three months of injury, the animals were euthanized, the spinal cord and the bladder were removed and performed histological staining with hematoxylin-eosin (H&E) and Masson trichrome. There were no changes in scores both groups A and B (score 0 in BBB scale, no movement of the lower limbs). It was observed clinical improvement in urinary bladder function in group B, and 83.33% of the animals showed no retention/incontinence, an average of 7.6 days after the second stem cells application. Histological analysis of the spinal cord showed no significant difference between groups A and B. Regarding the histological evaluation of the bladder, there was no histological difference between groups A and B. Also no difference between the groups was seen in relation to normal bladder. It was performed in two animals, qualitative evaluation by bioluminescence, with purpose of identifying the location and intensity of hADSC after applications in vivo. Higher intensity signal was observed at the second injection and hADSC cells was identified on application site and lungs. The presented results indicate that the transplant of hADSC in rats with SCI may be associated with an improvement in urinary retention/incontinence.

Keywords: Stem cell. Spinal cord. Bioluminescence. Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BNDF | Fator neurotrófico derivado do cérebro |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| Cm ² | Centímetro quadrado |
| CTDAs | Células-tronco derivadas de tecido adiposo |
| CTMs | Células-tronco mesenquimais |
| GDNF | Fator neurotrófico derivado da glia |
| G | Gramas |
| hCTDAs | Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano |
| HE | Hematoxilina-eosina |
| LRM | Lesão Raquimedular |
| mL | Mililitro |
| MP | Metilprednisolona |
| NGF | Fator de crescimento derivado do nervo |
| NT3 | Neurofinas do tipo 3 |
| NT4 | Neurofinas do tipo 4 |
| PBS | Solução salina fosfatada |
| PFA | Paraformaldeído |
| SBF | Soro bovino fetal |
| SCI | Lesão da medula espinhal (Spinal cord injury) |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNP | Sistema nervoso periférico |
| SSMP | Succinato sódico de metilprednisolona |
| TA | Tecido adiposo |
| TM | Tricrômico de Masson |
| µm | Micrômetros |
| µg | Microgramas |

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

| | Página |
|---|---------------|
| Gráfico 1. Demonstração do Fluxo total em fótons/segundo do sinal de bioluminescência. Nota-se um aumento de sinal na segunda aplicação, que corresponde aos dias 7 e 8. | 28 |
| Tabela 1. Demonstração do Fluxo total em fótons/segundo nos dias das aplicações das CTDA's marcadas. O Fluxo total se refere à quantidade de bioluminescência emitida no momento da avaliação | 28 |
| Tabela 2. Avaliação histológica qualitativa da bexiga dos grupos A e B. Na coloração HE foi avaliada inflamação e hemorragia. Na coloração TM avaliou-se fibras colágenas | 33 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Indução do trauma raquimedular. Laminectomia dorsal em rato <i>Wistar</i> e exposição raquimedular (A). Posicionamento do cateter de Fogarty nº 3 (B). Cateter de Fogarty inflado (C). | 20 |
| Figura 2. Transplante de CTDA's na veia da cauda de rato <i>Wistar</i> . (A) Seringa de Hamilton utilizada para o transplante. (B) Momento do transplante intravenoso de CTDA's. | 22 |
| Figura 3. Equipamento IVIS Lumina (Caliper LifeSciences Hopkinton, MA, USA) utilizado para avaliação pós-transplante das CTDA's <i>in vivo</i> por meio de bioluminescência. | 24 |
| Figura 4. Rato <i>Wistar</i> com edema pulmonar neurogênico após lesão medular por compressão. (A) Aspecto macroscópico do pulmão apresentando congestão, edema e hemorragia (seta amarela). (B). Presença de epistaxe e hemoptise (seta vermelha). | 27 |
| Figura 5. Rastreamento da distribuição das CTDA's injetadas no animal 1. Imagens do rato 1 nos 5 dias de avaliação. Observa-se maior sinal de bioluminescência nos dias 7 e 8, de acordo com a barra colorimétrica a direita das imagens. | 29 |
| Figura 6. Rastreamento da distribuição das CTDA's injetadas no animal 1. Animal 1, no dia 1. Observa-se a presença de CTDA's marcadas nos pulmões. | 29 |
| Figura 7. Rastreamento da distribuição das CTDA's injetadas no animal 1 após eutanásia. Imagem do segmento medular lesionado adicionado ao substrato Luciferina e avaliado no equipamento IVIS Lumina. Não foi observada a presença de CTDA's marcadas pela Luciferase no local da LRM. | 30 |

- Figura 8. Cortes histológicos utilizados para mensurar o perímetro da medula. Imagem de uma medula normal e sua respectiva medida (em vermelho) (A). Imagem de uma medula de um animal do grupo B e sua respectiva medida (em vermelho) (B). (Coloração H.E. Aumento 40x). 31
- Figura 9. Aspecto histológico do corte transversal de medula espinhal normal (1). Grupo A (2) e Grupo B (3) apresentando espaçamentos na substância branca (setas) compatíveis com área de necrose. (Coloração H.E. Aumento 200x). 32
- Figura 10. Corte histológico de bexiga normal (1), grupo A (2) e grupo B (3). Aspecto histológico de cortes transversais de bexiga exibindo aspectos de normalidade (Coloração TM Aumento 100x). 33

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O trauma raquimedular é uma afecção neurológica frequente na prática clínica veterinária e sua gravidade está relacionada com a severidade das lesões, que podem determinar consequências irreversíveis. Seu tratamento ainda permanece um desafio tanto para a Medicina como para a Medicina Veterinária porque, além de não ocorrer regeneração neuronal, não há consenso sobre o tratamento ideal (Arias et al., 2007).

A causa mais comum de trauma raquimedular em cães e gatos é o acidente automobilístico, seguido de quedas, brigas e trauma por arma de fogo (Braund, 1994; Seim III, 2005; Lorenz, 2006). Além das causas traumáticas, extrusão e protrusão de disco intervertebral, êmbolo fibrocartilaginoso e neoplasias podem provocar interrupção anatômica, compressão, concussão e/ou isquemia a medula espinhal (Arias et al., 2007).

O tratamento dos animais acometidos deve sempre ser considerado emergencial, visto que a intervenção rápida e adequada em intervalo de tempo apropriado pode limitar a extensão dos danos ao tecido neuronal, favorecendo assim a recuperação neurológica do paciente (Arias et al., 2007). A terapia clínica, cirúrgica ou a associação de ambas dependerá das afecções envolvidas e, cada caso deve ser individualmente avaliado (Lecouteur e Grandy, 2005).

Os glicocorticoides, em altas doses, têm sido utilizados no tratamento do trauma raquimedular, com melhora na perfusão microvascular, no metabolismo medular e em medidas histomorfométricas (Constantini e Young, 1994). A metilprednisolona (MP) administrada em altas doses, iniciada em menos de oito horas após o trauma, melhora a função de alguns grupos musculares (Vialle et al., 2007a). Acredita-se que os mecanismos de ação da MP sejam a inibição da peroxidação lipídica, diminuição da degeneração do axônio, prevenção de isquemia e a reversão do acúmulo de cálcio intracelular (Constantini e Young, 1994; Hall, 2001). Apesar das inúmeras pesquisas envolvendo a MP, os resultados apresentam-se muito variáveis, necessitando mais estudos para a determinação da dose e dos seus efeitos (Vialle et al.,

35 2007a).

36 Uma alternativa promissora no tratamento regenerativo da medula
37 espinhal lesionada são os transplantes celulares, como a utilização de células-
38 tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs são encontradas no estroma de vários
39 órgãos, e também são denominadas como células-tronco estromais e células
40 progenitoras mesodérmicas. Foram descritas inicialmente em 1970 por
41 Friedenstein e colaboradores, em referência ao tipo celular aderente com
42 formato fusiforme semelhante aos fibroblastos. De todas as linhagens de
43 células-tronco somáticas estudadas até o presente momento, as CTMs
44 apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não
45 mesodermis (Meirelles et al., 2006).

46 Além da medula óssea, as CTMs podem ser obtidas a partir de vários
47 tecidos como a polpa dentária, o tecido adiposo, tendão, sangue de cordão
48 umbilical, placenta, dentre outros (Soares et al., 2006). Estudos utilizando
49 células mesenquimais do tecido adiposo humano mostram que há uma
50 capacidade proliferativa e de diferenciação adequada destas células e que elas
51 têm um potencial de proliferação superior ao das células extraídas da medula
52 óssea (Lee et al., 2004; Kima et al., 2007).

53 O objetivo deste estudo foi avaliar os resultados da terapia com células-
54 tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano aplicadas via
55 intravenosa em ratos submetidos a trauma raquimedular.

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

CAPITULO 2

69

70

71 2 REVISÃO DE LITERATURA

72

73 2.1 TRAUMA RAQUIMEDULAR

74

75 As principais funções da medula são motricidade, sensibilidade e ações
76 reflexas, e podem ser interrompidas devido a infecções, alterações congênitas,
77 doenças degenerativas, tumores, compressão vascular e eventos traumáticos.
78 A medula espinhal não é somente uma estrutura anatômica de trânsito de
79 estímulos do cérebro às extremidades e vice-versa, mas é parte complexa do
80 sistema nervoso central (SNC), capaz de regular seu fluxo sanguíneo e a
81 passagem destes estímulos, com a variação da excitabilidade de corpos
82 neuronais e seus axônios (Meyer et al., 2003).

83 A coluna toracolombar é o local mais comum para fraturas, luxações e
84 subluxações vertebrais, ocorrendo na região torácica caudal em 50 a 60% dos
85 pacientes. Isto ocorre porque esta região da coluna vertebral apresenta maior
86 mobilidade, quando comparada a áreas adjacentes mais estáveis do esqueleto
87 axial. As forças que atuam no local da lesão são provavelmente resultado de
88 hiperextensão, hiperflexão, compressão axial e rotação. Uma falha em resistir a
89 tais forças causa descontinuidade mecânica com compressão da medula
90 espinhal e de raízes nervosas. Fraturas da coluna torácica que envolvem T1 a
91 T9 são incomuns graças à estabilidade obtida por meio de massa muscular
92 epaxial, das ligações costais, do suporte ligamentar e das ligações musculares
93 intercostais (Seim III, 2005).

94 A compressão traumática da medula espinhal cervical, ao contrário
95 daquela na área toracolombar, pode ser responsável por dor acentuada com
96 menores déficits neurológicos. Entretanto, a compressão extensa resulta em
97 disfunção grave motora e sensorial. As lesões craniais a C5 podem causar
98 morte súbita pelo rompimento dos ramos respiratórios aos neurônios motores
99 frênicos e intercostais. A tetraplegia com perda da sensação de dor profunda
100 caudal a lesão, conseqüentemente, será rara, uma vez que os animais
101 acometidos morrem de insuficiência respiratória (Lorenz, 2006).

102 O desafio da neurologia tem sido vencer a falta de regeneração

103 espontânea do SNC após a perda de neurônios e/ou interrupção de seus
104 prolongamentos, os dendritos e os axônios. Embora possa haver recuperação
105 parcial dos sintomas, as melhoras funcionais observadas após lesão cerebral
106 ou medular são decorrentes de fenômenos de plasticidade sináptica e não de
107 reparo estrutural. A maioria dos esforços científicos atuais concentra-se no
108 desenvolvimento e na aplicação de estratégias visando a limitação das
109 consequências do dano ao SNC e a ampliação do potencial regenerativo dos
110 neurônios lesados. Ao contrário do que ocorre no SNC, o sistema nervoso
111 periférico (SNP) apresenta capacidade regenerativa pós-trauma, de modo que
112 grande parte de lesões de nervos, atualmente, não mais significam perda de
113 função, desde que abordadas microcirurgicamente de maneira adequada
114 (Gebrin, 1997).

115

116 2.2 FISIOPATOLOGIA DO TRAUMA RAQUIMEDULAR

117

118 A lesão medular é caracterizada pelo conjunto de situações que ocorrem
119 nos neurônios do SNC do canal vertebral, desde o forame magno até a região
120 lombossacra, culminando em graus variados de extensão e comprometimento
121 fisiológico (Meyer et al., 2003)

122 Pode ser aguda ou crônica, iniciando uma sequência de eventos
123 vasculares, bioquímicos e inflamatórios, que geram danos teciduais
124 secundários, levando à destruição progressiva do tecido neuronal. A lesão
125 aguda pode resultar de extrusão de disco intervertebral, êmbolo
126 fibrocartilagenoso ou traumatismo vertebral. A lesão medular crônica pode vir
127 acompanhada de compressão progressiva da medula espinhal e provir de
128 protrusão de disco, neoplasias e instabilidade vertebral (Arias et al., 2007).

129 A lesão medular primária é causada pela transferência de energia
130 cinética, que resulta da força do impacto traumático, gerando a interrupção
131 mecânica direta e é esta força que define a extensão da lesão, evento que
132 ocorre imediatamente após o trauma. Neste momento pode ocorrer o
133 rompimento dos axônios, lesão às células nervosas e ruptura dos vasos
134 sanguíneos, ocasionando hemorragia e necrose da substância cinzenta, com
135 formação de petéquias e necrose central hemorrágica, que pode se estender
136 para a substância branca devido à redução geral do fluxo sanguíneo no local

137 lesionado. Esta é a fase aguda e ocorre nas primeiras oito horas após o trauma
138 medular. Em seguida inicia-se a cascata de eventos destrutivos que levam às
139 lesões teciduais secundárias. É nesta fase que ocorrem as perdas de tecido
140 neuronal (Defino, 1999).

141 Vialle et al. (2007b) descrevem que os processos secundários
142 associados com o trauma raquimedular (TRM) incluem edema, isquemia,
143 inflamação, toxicidade celular, alteração na homeostase iônica, liberação
144 excessiva de citocinas, ativação enzimática alterada e apoptose. Braund (1994)
145 ressalta que essas alterações são mais graves na substância cinzenta, com
146 subsequente propagação para a substância branca. A maior vulnerabilidade da
147 substância cinzenta pode ser devido a vários fatores. Em contraste com os
148 protegidos tratos da substância branca, os neurônios da substância cinzenta
149 são facilmente separados por fluido ou sangue, por causa da rígida membrana
150 que a envolve. Qualquer aumento da pressão intramedular (secundário à
151 hemorragia ou edema) está concentrado centralmente; os tecidos lesados têm
152 uma demanda metabólica além do normal, embora a proporção do fluxo
153 sanguíneo seja de cinco para um para a substância cinzenta e branca, as
154 necessidades metabólicas da substância cinzenta podem exceder as
155 disponibilidades do fluxo sanguíneo.

156 Na lesão primária ocorre a ruptura e esmagamento de elementos
157 neuronais, gerando a interrupção dos impulsos nervosos, e simultaneamente
158 ocorrem lesões vasculares, hemorragias e perda da auto regulação sanguínea,
159 levando às lesões secundárias da medula espinhal. Neste momento ocorrem
160 as anormalidades vasculares, como perda da auto regulação, que leva à
161 hipotensão sistêmica, diminuindo a microcirculação e conseqüentemente
162 causando a isquemia neuronal e diminuição nas reservas de ATP (adenosina
163 trifosfato), levando ao acúmulo de radicais livres, o que ocasiona a peroxidação
164 lipídica. Em contrapartida, eventos bioquímicos decorrentes do aumento da
165 permeabilidade da membrana facilitam o aumento da concentração intracelular
166 de elementos como o cálcio (Ca⁺), sódio (Na⁺) e potássio (K⁺), que ativam
167 proteases como a calpaína e a caspase, destruindo o citoesqueleto e o DNA
168 cromossomal, iniciando a necrose (calpaína) e a apoptose (calpaína e
169 caspase). Este evento também dá início à liberação de mediadores
170 inflamatórios como citocinas, interleucina 1, fator de necrose tumoral,

171 leucotrienos, prostaglandinas, recrutamento de células inflamatórias como
172 neutrófilos e macrófagos. Nesta fase da reação inflamatória ocorre a
173 desmielinização secundária e perda de axônios. É possível observar na medula
174 espinhal lesionada a presença de leucócitos polimorfonucleares fagocíticos, no
175 interior e adjacente às paredes celulares e às áreas de hemorragia, o que
176 sugere que o trauma induz a ativação das lípases das membranas, hidrolisa
177 seus fosfolípídeos e libera ácidos graxos, principalmente o ácido aracdônico.
178 Além desses eventos, ocorre a liberação de opióides endógenos, contribuindo
179 para hipotensão sistêmica, reduzindo o fluxo sanguíneo na medula espinhal,
180 agravando a isquemia (Arias et al., 2007).

181

182 2.3 BEXIGA NEUROGÊNICA

183

184 As vias neurais que controlam as funções do trato urinário inferior são
185 capazes de manter uma relação funcional recíproca entre a vesícula urinária e
186 a uretra. Os reflexos de armazenamento são ativados durante o enchimento da
187 bexiga e organizados primariamente na medula espinhal, enquanto que os
188 reflexos de esvaziamento são mediados por mecanismos reflexos que são
189 controlados pelo cérebro. A regulação supra espinhal das funções do trato
190 urinário inferior depende de múltiplas vias, as quais conduzem informações
191 entre o cérebro e a medula espinhal (Forner, 2011).

192 No cérebro, populações neuronais estão envolvidas no controle da
193 bexiga, uretra e esfíncter uretral. Neurônios serotoninérgicos presentes no
194 núcleo da rafe, neurônios noradrenérgicos do loco cerúleo e as células
195 noradrenérgicas A5 no tronco cerebral, representam mecanismos não
196 específicos com projeções espinhais difusas. Outros grupos neuronais são
197 específicos para a micção e entre eles estão os neurônios do núcleo de
198 Barrington, conhecido também como centro pontino da micção, que está
199 localizado nas regiões medial e dorso lateral da ponte, e aqueles da substância
200 cinzenta periaquedutal que estão localizados nos neurônios de várias partes do
201 córtex cerebral, em particular no córtex frontal medial. Algumas destas áreas
202 cerebrais apresentam conexões entre si e também entre o cérebro e a medula
203 espinhal lombo-sacral (Fowler et al., 2008).

204 A medula espinhal lombo-sacral contém as vias eferentes autonômicas

205 que integram o nervo pélvico (parassimpático), hipogástrico (simpático) e
206 pudendo (somático). Estes nervos são responsáveis pela condução da
207 informação sensorial do trato urinário inferior para a medula espinhal (Fry et al.,
208 2010). Essa via participa do controle voluntário da micção sobre o trato urinário
209 inferior (Anderson e Arner, 2004).

210 O traumatismo na medula espinhal pode resultar em alterações no
211 funcionamento do sistema urinário, além de comprometimento intestinal,
212 respiratório, circulatório, sexual e reprodutivo (Lianza et al., 2001). As lesões
213 medulares em nível torácico e lombar resultam em disfunções do trato urinário
214 inferior, tais como a hiperatividade da bexiga urinária, dissinergia vesico-
215 esfíncteriana e retenção urinária (Forner, 2011).

216 A hiperatividade da bexiga urinária de origem neurogênica é uma
217 consequência frequente em pacientes com trauma medular. A intensidade da
218 hiperatividade da bexiga e a coordenação ou não entre o músculo detrusor e o
219 esfíncter uretral são determinados pela altura e a extensão da lesão. Lesões
220 completas que afetam qualquer parte do circuito de reflexo de esvaziamento da
221 bexiga, entre os quais os níveis sacrais S2-S4 ou os aferentes/eferentes
222 parassimpáticos, produzem bexiga flácida e paralisada, que se enche
223 excessivamente de urina e ocorre transbordamento por falta de distensão
224 muscular. Ao contrário, lesões completas acima da região sacral interrompem
225 os axônios descendentes que controlam normalmente a função vesical, mas
226 não interrompem o controle reflexo da bexiga, que inicialmente torna-se
227 arreflexa, podendo ocorrer retenção urinária e incontinência por
228 transbordamento seguida de restabelecimento do reflexo de micção mediado
229 pelo arco reflexo medular. Isso acarreta o que é conhecido por bexiga
230 hipertônica e hiper-reflexiva (De Groat e Yoshimura, 2006).

231 Podem ocorrer múltiplas complicações quando a inervação normal para
232 a bexiga e o esfíncter urinário está comprometida. As complicações comuns
233 incluem incontinência urinária, infecção do trato urinário, sofrimento do trato
234 urinário superior, cálculos urinários, disreflexia autonômica e câncer de bexiga
235 (Gray, 2006).

236 Após o trauma medular, observam-se importantes alterações
237 eletrofisiológicas dos neurônios aferentes da bexiga urinária, por meio de
238 mudanças nos canais de sódio e aumento na função desses canais sensíveis à

239 tetrodotoxina (De Groat e Yashimura, 2006). Neurônios de ratos com lesão
240 medular apresentam maior número de potenciais de ação (De Groat e
241 Yashimura, 2010). Essa mudança nas propriedades dos canais de sódio pode
242 aumentar o reflexo espinhal, que promove maior número de contrações do
243 músculo detrusor. As mudanças nas propriedades dos neurônios aferentes da
244 bexiga urinária após a lesão medular podem ainda estar relacionadas à
245 neuroplasticidade, mediada pelo fator de crescimento derivado do nervo (NGF),
246 o qual é liberado tanto pela medula espinhal quanto pela bexiga urinária. A
247 liberação aumentada de NGF induz tanto hiperexcitabilidade do órgão, quanto
248 distensão e baixa eficácia de esvaziamento do mesmo (Vizzard, 2000; Gray,
249 2006; De Groat e Yashimura, 2006). Além do NGF, os níveis de outros fatores
250 de crescimento, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o
251 fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e das neurofinas do tipo 3 e 4 (NT3
252 e NT4) encontram-se aumentados após a lesão medular, favorecendo a
253 neuroplasticidade das vias que inervam a bexiga urinária (Vizzard, 2006).

254

255 2.4 TRATAMENTO CLÍNICO DA LESÃO RAQUIMEDULAR

256

257 O trauma medular agudo deve ser considerado como emergência
258 médica, e a principal preocupação no primo atendimento deve ser a
259 estabilização do estado geral, buscando tratar o choque e hemorragias quando
260 estas existirem. O Médico Veterinário deve estar atento não só à medula
261 espinhal em casos de trauma, mas também aos danos causados em órgãos
262 das cavidades torácica e abdominal, como hérnias diafragmáticas, ruptura de
263 baço e bexiga, entre outros. Conforme comenta Lorenz (2006), existe pouco
264 benefício no reparo bem-sucedido para a fratura espinhal apenas para ter o
265 animal morto dias depois por hérnia diafragmática ou por bexiga rompida.

266 O ideal para o manejo primário do paciente com trauma medular agudo
267 consiste portanto na execução do ABC do trauma, ou seja, manutenção de vias
268 aéreas, respiração, circulação, imobilização do paciente, oxigenação,
269 manutenção da pressão sanguínea e imobilização da coluna vertebral quando
270 indicado (Arias et al., 2007).

271 Durante o período da primeira avaliação e do tratamento, o animal deve
272 ficar contido para evitar lesão adicional da medula espinhal. Os animais devem

273 ser transportados em maca rígida ou tábua. O movimento deve ser
274 desestimulado, especialmente se, fratura, luxação ou subluxação vertebrais
275 forem suspeitas (Lorenz, 2006). O exame neurológico completo é essencial
276 para avaliar a localização da lesão medular, o grau de severidade e fornecer
277 um prognóstico preciso. Em muitos casos a alteração é tão discreta que a
278 função normal pode retornar sem qualquer tratamento (Arias et al., 2007).

279 Uma vez ocorrida a lesão primária medular, poucos recursos cirúrgicos e
280 farmacológicos estão atualmente disponíveis e nenhum é capaz de reverter
281 totalmente os danos da lesão inicial. Farmacologicamente, drogas moduladoras
282 das respostas endógenas à lesão estão sendo progressivamente introduzidas,
283 a fim de melhorar o potencial de recuperação funcional desses pacientes.
284 Essas drogas visam interromper os mecanismos fisiopatológicos de lesão
285 neuronal secundária (Gebrin, 1997).

286 Apesar de estudos controversos sobre a eficácia do succinato sódico de
287 metilprednisolona (SSMP) no trauma medular, muitos autores, médicos e
288 médicos veterinários indicam a administração do fármaco. Em estudos
289 experimentais realizados por Tebet et al. (2003) em ratos e gatos, onde foram
290 aplicadas altas doses de SSMP, atribui-se que seu mecanismo de ação atue na
291 inibição da enzima peroxidase lipídica, prevenindo a isquemia e a degeneração
292 de neurofilamentos, dentre outros benefícios. Lorenz (2006) indica o uso de
293 SSMP, na dosagem inicial de 30 mg/Kg, por um período de 10 minutos,
294 seguido de infusão contínua de 5mg/Kg por hora, durante 24 horas. O autor
295 ressalta que esse fármaco é benéfico na prevenção e no tratamento do edema
296 do SNC e das reações bioquímicas secundárias no tecido nervoso, porém para
297 ser eficaz, a dose inicial de SSMP deve ser administrada dentro de oito horas
298 após a lesão, pois a administração de corticoides depois de decorridas oito
299 horas pode ser nociva. Vialle et al. (2007a) citam que os efeitos indesejáveis do
300 SSMP observados são: complicações respiratórias, sangramentos
301 gastrointestinais e taxas elevadas de infecção pós-operatória.

302 O uso de manitol é controverso, porém Lorenz (2006) recomenda que
303 após recuperação da volemia e estabilização do animal a terapia com manitol a
304 20% seja instituída. O autor diz que este diurético osmótico hipertônico age
305 rapidamente para reduzir o edema na medula espinhal e está indicado em
306 conjunto com os corticosteroides. Ele é administrado na dosagem de 0,5g/Kg

307 de peso corpóreo por 30 minutos. A terapia com manitol é repetida em duas a
308 três horas e então é interrompida.

309 Embora muitas fraturas vertebrais possam ser tratadas clinicamente, a
310 intervenção cirúrgica é indicada para fraturas instáveis. Porém um estudo com
311 211 cães e gatos com fraturas vertebrais encontrou mínimas diferenças entre o
312 tratamento clínico e cirúrgico (Lorenz, 2006).

313 Dewey (2006) cita alguns tratamentos experimentais que embasam a
314 terapia da lesão de medula espinhal aguda com a estimulação do campo
315 oscilatório, que consiste na aplicação de um fraco campo elétrico de polaridade
316 oscilante na região lesionada. Acredita-se que esse tratamento favoreça os
317 processos de reparo de neurônios e axônios. Outro tratamento citado pelo
318 autor é a aplicação de polietilenoglicol, com intuito de restabelecer as funções
319 das membranas celulares.

320 Pesquisas também tem avaliado a eficácia da hipotermia como agente
321 neuroprotetor. Kwon et al. (2008) comentam que as provas que sustentam o
322 efeito benéfico da hipotermia em modelos animais com LRM são variáveis, pois
323 a interpretação de estudos em animais submetidos à hipotermia após a lesão
324 medular é dificultada pela utilização de diferentes modelos animais,
325 mecanismos causadores e gravidade da lesão, e as variações no tempo,
326 duração e o grau de hipotermia. Desta forma, é difícil sugerir que a hipotermia
327 sistêmica atue como neuroprotetora após trauma raquimedular agudo.

328 Alguns fármacos com propriedades neuroprotetoras estão em estudo
329 para o uso no trauma medular agudo. Além dos esteroides como o SSMP,
330 bloqueadores dos canais de cálcio e sódio, antioxidantes e varredores de
331 radicais livres, inibidores do metabolismo do ácido aracdônico, barbitúricos,
332 antagonistas dos opióides, hormônio liberador da tirotrópina, progesterona,
333 dentre outros são utilizados na prática clínica e em nível experimental
334 (Janssens, 1986; Olby, 1999; Bergman et al., 2000). Agentes como os
335 inibidores da caspase e da calpaína mostraram-se opções promissoras no
336 tratamento do trauma medular. Em pesquisa realizada por Cheng et al.(1998),
337 as caspases reduziram o edema e a inflamação, prevenindo a morte celular,
338 inclusive de neurônios. Inibidores da calpaína aplicados diretamente na medula
339 espinhal de ratos, antes das lesões, possibilitaram melhora significativa da
340 função neurológica seis semanas após o trauma.

341 Transplantes celulares para as áreas de tecido nervoso lesado, como o
342 implante de blocos de tecido do SNC fetal, células nervosas da bainha olfatória,
343 encontradas no bulbo e nervo olfatórios, e células de Schwann, podem
344 promover o crescimento e regeneração axonal, contribuindo na recuperação
345 neurológica de pacientes com lesão medular. Diversos estudos têm sido feitos
346 com o uso de células-tronco, pela sua capacidade de se diferenciar em outras
347 células. Estudos com estas células têm o objetivo de reconstituir a
348 comunicação entre o cérebro e os membros, porém ainda serão necessários
349 muitos anos até que o transplante celular seja considerado uma possibilidade
350 rotineira de tratamento (Arias et al., 2007).

351

352 2.5 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

353

354 A partir de 1945, após a exposição de populações civis a doses letais de
355 radiação, iniciaram os estudos de células-tronco, mais precisamente em 1956,
356 através de experimentos com camundongos irradiados, onde alguns grupos
357 mostraram que o transplante de medula óssea protegia esses animais dos
358 efeitos da radiação (Otero et al., 2006).

359 As células-tronco são classificadas de acordo com sua capacidade de
360 diferenciação e, conforme o seu nível de plasticidade, são denominadas de
361 totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (Souza et al., 2003).

362 Células-tronco embrionárias são células com capacidade ilimitada ou
363 prolongada de autoperpetuação, que podem se diferenciar em qualquer tipo
364 celular específico por meio de diferenciação em linhagens intermediárias.
365 Células-tronco totipotentes podem originar tanto um organismo totalmente
366 funcional, como qualquer tipo celular do organismo, inclusive todo o sistema
367 nervoso central e periférico (Gage, 2000). Correspondem às células do embrião
368 recém-formado e têm potencial para originar até mesmo as células do folheto
369 extraembrionário que formarão a placenta. Entretanto, estas células são
370 efêmeras e desaparecem poucos dias após a fertilização (Robey, 2000).

371 Quando o embrião está entre o terceiro e o quinto dia de idade, encontra-se
372 na fase de blastocisto e contém células-tronco pluripotentes, capazes de gerar
373 vários órgãos e tecidos que formam o feto, exceto anexos embrionários
374 (Franchini et al., 2002).

375 A primeira linhagem de células-tronco embrionárias foi isolada em 1998.
376 Estudos em animais mostraram que, frequentemente, estas células quando
377 transplantadas para um determinado órgão, formavam teratomas ou
378 teratocarcinomas devido a sua pluripotencialidade. Outro fator que dificulta a
379 utilização destas células são as questões éticas e legais (Otero et al., 2006).

380

381 2.6 CELULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

382

383 Nos anos 60 pesquisadores descobriram que a medula óssea contém
384 pelo menos dois tipos de células-tronco. Uma população chamada células-
385 tronco hematopoiéticas, que formam todos os tipos de células sanguíneas do
386 corpo. Outra população celular chamada de células do estroma da medula
387 óssea (mesenquimais ou unidades formadoras de colônias fibroblásticas) foi
388 descoberta alguns anos mais tarde e geram osso, cartilagem, gordura e o
389 tecido conjuntivo fibroso (Del Carlo, 2005; Bittencourt et al., 2006).

390 As células-tronco adultas aparentemente têm capacidade de
391 autorrenovação limitada e são denominadas multipotentes, pela capacidade de
392 diferenciação em alguns tipos celulares (Souza et al., 2010). Podem se
393 diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de
394 reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células
395 epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (Pittenger et al., 1999).

396 As células-tronco mesenquimais (CTMs) são encontradas no estroma de
397 vários órgãos, e também são denominadas como células-tronco estromais ou
398 células progenitoras mesodérmicas. Foi descrita inicialmente em 1970 por
399 Friedenstein e colaboradores, em referência ao tipo celular aderente com
400 formato fusiforme semelhante aos fibroblastos. Além da medula óssea, as
401 CTMs podem ser obtidas a partir de vários tecidos como a polpa dentária, o
402 tecido adiposo, tendão, sangue de cordão umbilical, placenta, dentre outros
403 (Soares et al., 2006).

404 Suas características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o
405 responsável pelo *turnover* e pela manutenção de todos os tecidos do
406 organismo (Caplan, 2009). Elas tornaram-se foco de inúmeras pesquisas em
407 todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia
408 celular. De todas as linhagens de células-tronco somáticas estudadas até o

409 presente momento, as CTMs apresentam maior plasticidade, originando
410 tecidos mesodermis e não mesodermis (Meirelles et al., 2006). Entretanto
411 seus mecanismos de plasticidade não são totalmente compreendidos (Monteiro
412 et al., 2009). Acredita-se que sua plasticidade ocorra por meio de
413 transdiferenciação, onde as células alterariam sua expressão gênica para uma
414 linhagem celular diferente, originando tipos celulares distintos (Herzog et al.,
415 2003). Outro mecanismo é a fusão, que é quando a célula-tronco mesenquimal
416 se junta a uma célula alvo, assumindo o padrão de expressão gênica da célula
417 adulta a qual se uniu. A fusão celular é um fenômeno biológico amplamente
418 conhecido, ocorrendo principalmente nas células cuja poliploidia (dois ou mais
419 conjuntos de cromossomos) é comumente vista, como em hepatócitos e
420 células musculares esqueléticas (Herzog et al., 2003; Meirelles et al., 2006).

421 As CTMs secretam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento
422 que possuem atividade tanto parácrina como autócrina. Acredita-se que essa
423 propriedade seja de fundamental importância para a explicação dos efeitos
424 terapêuticos observados com essas células. Esses fatores secretados pelas
425 CTMs exercem ação antiapoptótica, pró-angiogênica e efeito reparador
426 endógeno (Gnecchi et al., 2008). A isquemia aumenta a produção de diversos
427 fatores, tais como fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento
428 de fibroblasto básico, fator de crescimento dos hepatócitos, fator de
429 crescimento insulina-like e adrenomedulina (Yon et al., 2005; Nagaya et al.,
430 2005). Além disso, as CTMs possuem a capacidade de se acumular ao redor
431 de processos inflamatórios e tumorais quando administradas *in vivo*. Por esse
432 motivo, essas células podem ser utilizadas em situações clínicas como terapia
433 regenerativa, tratamento da doença do enxerto contra hospedeiro e terapia
434 gênica para o câncer. Atualmente sabe-se que as células-tronco mesenquimais
435 podem imunomodular tipos celulares tanto do sistema imune inato como do
436 sistema imune adaptativo, tais como células dendríticas, células NK,
437 neutrófilos, linfócitos T e B, e células T regulatórias. Na presença de células-
438 tronco mesenquimais, as células dendríticas maduras diminuem a expressão
439 de moléculas de superfície, tais como MCH II, CD11c, CD83 e moléculas
440 coestimulatórias, além da diminuição da secreção de IL-12. A diminuição da
441 expressão dessas moléculas e da secreção dessa citocina prejudica a
442 apresentação antigênica por essa célula (Bartholomew et al., 2002). A inibição

443 de células T por células-tronco mesenquimais leva à diminuição da produção
444 de INF- tanto *in vitro* como *in vivo* e ao aumento da produção de IL-4,
445 caracterizando uma alteração no perfil da resposta imune de pró-inflamatório
446 para anti-inflamatório (Nauta et al., 2006).

447 O transplante de CTMs é atualmente um procedimento altamente
448 experimental, lembrando os primórdios do transplante de células-tronco
449 hematopoiéticas. Neste último caso, a medula óssea foi substituída
450 progressivamente por células progenitoras do sangue periférico e de sangue do
451 cordão umbilical. Levando-se em conta as vantagens e desvantagens de fontes
452 como a medula óssea, sangue do cordão umbilical e tecido adiposo,
453 dependendo da indicação terapêutica, as aplicações clínicas podem ter como
454 base a capacidade de diferenciação, porém é mais provável que a frequência e
455 o potencial de expansão das células sejam os principais critérios na escolha da
456 melhor fonte (Kern et al., 2006). Estudos utilizando CTMs do tecido adiposo
457 humano mostram que há uma capacidade proliferativa e de diferenciação
458 adequada destas células e que elas têm um potencial de proliferação superior
459 ao das células extraídas da medula óssea (Lee et al., 2004; Kima et al., 2007).

460

461 2.7 TERAPIA CELULAR E A MEDICINA VETERINÁRIA

462

463 Nas últimas décadas a medicina regenerativa tem se destacado em todo
464 o mundo, graças ao surgimento da terapia com CTMs, reconstruindo tecidos
465 lesionados (Branco et al., 2009). Os resultados já estabelecidos e as
466 possibilidades de sucesso estão gerando grandes expectativas entre a
467 comunidade científica e a população leiga (Del Carlo et al., 2009). Estudos
468 recentes descrevem a utilização alógena e autógena das células-tronco para
469 a reparação de diversos tecidos. A grande aplicação em Medicina Veterinária
470 se deve à geração de modelos experimentais aplicáveis em paciente humanos
471 (Monteiro et al., 2009). Estes modelos permitiram que a ciência animal
472 obtivesse dados clínicos precoces. Lee et al., (2007) realizaram o
473 transplante de CTMs em ratos submetidos à LRM, os pesquisadores
474 observaram uma melhora funcional, de acordo com testes comportamentais
475 (BBB), eletrofisiológicos e imunohistoquímica. Em pesquisa iniciada em 1998 e
476 publicada no ano de 2001, Barros et al. (2001) realizaram a aplicação

477 percutânea de células mononucleares da medula óssea na reparação de falhas
478 experimentais em rádio de coelhos, obtendo resultados promissores no
479 processo de reparação óssea em relação ao grupo controle, principalmente na
480 precocidade de formação do novo tecido. Orlic et al., (2001) realizaram um
481 estudo para regeneração do miocárdio, transplantando células-tronco Lin-c-
482 KitPOS derivadas da medula óssea, para regiões peri-infarto três a cinco horas
483 após a ligadura da artéria descendente anterior em camundongos, que
484 demonstrou regeneração dos miócitos cardíacos assim como de estruturas
485 vasculares, incluindo-se células endoteliais e musculares lisas. Corações que
486 receberam o transplante não demonstraram restituição completa da função,
487 mas apresentaram melhora hemodinâmica, nove dias após o infarto,
488 comparado com controles.

489 Em um estudo realizado por Gangji et al. (2004) com 13 pacientes
490 portadores de osteonecrose da cabeça femoral, os pesquisadores concluíram
491 que o implante de células mononucleares autólogas de medula óssea é um
492 tratamento seguro e eficaz para estágios precoces de osteonecrose da cabeça
493 femoral. Outros estudos realizados em casos de defeitos por não união,
494 tratados com uma matriz halogênica com uma única aplicação de aspirado da
495 medula óssea, resultou em regeneração óssea assegurada em 50% dos casos
496 que receberam matriz halogênica, permitindo a retenção das células
497 adicionadas e servindo como agente osteopromotor (Kraus e Kirked-Head,
498 2006).

499 O número de pesquisas visando a terapias reparativas utilizando células-
500 tronco tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, no Brasil e no
501 mundo (Otero et al., 2006). A terapia celular é uma alternativa terapêutica
502 promissora, porém a compreensão da biologia dessas células ainda é uma
503 ciência em formação.

504

CAPÍTULO 3

EFEITOS LOCOMOTORES E MICCIONAIS APÓS APLICAÇÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM LESÃO RAQUIMEDULAR EXPERIMENTAL

(Locomotors and micturitions effects after intravenous injection of Stem Cells in experimental spinal cord injury)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de regeneração da lesão medular em ratos submetidos à terapia celular com célula-tronco derivadas do tecido adiposo humano (hCTDAs). A lesão da medula espinhal dos ratos foi realizada por meio da compressão da região toracolombar (T8 - T9) com um cateter Forgaty nº. 3, durante cinco minutos. O *cuff* do cateter foi insuflado utilizando 80 µL de solução salina. Os 24 animais foram aleatoriamente separados em dois grupos iguais: grupo A, grupo controle, que recebeu apenas meio de cultura; grupo B foram transplantados com hCTDAs ($1,2 \times 10^6$ células). Em ambos os grupos a inoculação foi realizada por via intravenosa, no sétimo dia e décimo quarto dia após a lesão medular, via punção da veia da cauda. Após a compressão da medula a atividade locomotora dos animais foi avaliada usando a escala BBB, realizada em campo aberto a cada 15 dias, durante os 90 dias, num total de 6 avaliações. Após três meses da lesão, os animais foram eutanasiados, a medula espinhal e a bexiga foram removidos para avaliação histológica com as colorações Hematoxilina Eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TM) (somente para bexiga). Em dois animais foi realizada avaliação quantitativa por meio de bioluminescência, com o objetivo de identificar a localização e intensidade das hCTDAs após as aplicações *in vivo*. No período avaliado não houve mudanças nas pontuações para os grupos A e B com relação à movimentação dos membros inferiores (escore 0 na escala BBB). Observou-se melhoria clínica na função da bexiga urinária no grupo B, e 83,33% dos animais não apresentavam qualquer retenção / incontinência urinária, em média 8 dias após a segunda aplicação de hCTDAs. A análise histológica da medula não demonstrou diferença significativa entre os grupos A e B. Em relação à avaliação histológica da bexiga, não se observou diferença histológica entre os grupos A e B. Também não se evidenciou diferença entre os grupos em relação à bexiga normal. Pela bioluminescência foi observada maior intensidade de sinal na segunda aplicação de hCTDAs e a localização das células foi identificada no local de aplicação e nos pulmões. Os resultados indicam que o transplante de hCTDAs em ratos com LRM pode ser associado a uma melhora na retenção / incontinência urinária.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Medula espinhal. Bioluminescência. Ratos. Micção. Paraplegia.

550 **ABSTRACT**

551

552 The aim of this study was evaluate the regenerative capacity of spinal cord
553 injury in rats subjected to cell therapy with hADSCs. Spinal cord injuries (SCI)
554 were performed in rats by compressing the thoracolumbar region (Th8 - Th9)
555 with a catheter Forgaty n° 3 for five minutes. The cuff of the catheter was
556 inflated using 80 µL of saline solution. The animals were separated in two
557 groups of 12 individuals each: group A, control group received only culture
558 medium; group B were transplanted with hADSC. The intravenously transplant
559 was performed on the seventh day and fourteenth day after SCI and $1,2 \times 10^6$
560 cells were injected via puncture of the tail vein. The locomotor activity of the
561 animals was evaluated using a BBB scale developed by Basso et al, 1995. .
562 Locomotor activity after spinal cord contusion was analyzed on open field every
563 15 days during the 90 days, with total of 6 reviews. After three months of injury,
564 the animals were euthanized, the spinal cord and the bladder were removed
565 and performed histological staining with HE and TM. There were no changes in
566 scores both groups A and B (score 0 in BBB scale, no movement of the lower
567 limbs). It was observed clinical improvement in urinary bladder function in group
568 B, and 83.33% of the animals showed no retention/incontinence, on average, 8
569 days after the second application of stem cells. Histological analysis of the
570 spinal cord showed no significant difference between groups A and B.
571 Regarding the histological evaluation of the bladder, there was no histological
572 difference between groups A and B. It was not observed significative difference
573 between the groups in comparison to normal bladder. It was performed in two
574 animals, qualitative evaluation by bioluminescence, with the goal of identifying
575 the location and intensity of hADSC after applications in vivo. Was higher
576 intensity signal at the second location and applying hADSC cells was identified
577 application site and lungs. These results indicate that the transplant of hADSC
578 in rats with SCI may be associated with an improvement in urinary
579 retention/incontinence.

580

581 **Keywords:** Mesenchymal Stem cell. Spinal cord. Bioluminescence. Rats.
582 Micturition. Paraplegia.

583

584 **3.1 INTRODUÇÃO**

585

586 Capaz de gerar incapacidade permanente, o trauma raquimedular, em
587 muitos casos, é motivo de eutanásia para cães e gatos que se encontram nesta
588 condição patológica.

589 Os estudos que envolvem lesão medular experimental são fundamentais
590 para a compreensão dos mecanismos primários e secundários de lesão
591 tecidual decorrentes do trauma raquimedular (Meyer et al., 2003).

592 A técnica de compressão medular em cachorros por implantação de um
593 balão inflável no espaço extradural foi desenvolvida por Tarlov et al., (1953) e o

594 desenvolvimento de balões infláveis menores tornou possível o estudo em
595 animais de laboratório (Rivlin e Tator, 1978).

596 Tratamento clínico com fármacos neuroprotetores, tratamento cirúrgico
597 para descompressão do tecido medular afetado e tratamentos alternativos,
598 como acupuntura e fisioterapia, são as opções disponíveis no momento.

599 Uma alternativa promissora no tratamento regenerativo da medula
600 espinhal lesionada são os transplantes celulares, como a utilização de células-
601 tronco mesenquimais (CTMs) (Meirelles et al., 2006). As CTMs são
602 encontradas no estroma de vários órgãos, e também são denominadas como
603 células-tronco estromais ou células progenitoras mesodérmicas. Podem ser
604 obtidas a partir de vários tecidos como a polpa dentária, o tecido adiposo,
605 tendão, sangue de cordão umbilical, placenta, dentre outros (Soares et al.,
606 2006). Possuem a capacidade de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular
607 necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos,
608 hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras
609 (Pittenger et al., 1999).

610 Estudos utilizando CTMs do tecido adiposo humano mostram que há
611 uma capacidade proliferativa e de diferenciação adequada destas células e que
612 elas têm um potencial de proliferação superior ao das células extraídas da
613 medula óssea (Lee et al., 2004; Kima et al., 2007).

614 O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de regeneração das
615 lesões raquimedulares em ratos submetidos à terapia celular com hCTDAs,
616 injetadas por via intravenosa.

617

618 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

619

620 3.2.1 Animais

621

622 Os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios
623 éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, tendo sido aprovado
624 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade
625 Católica do Paraná (Protocolo nº 637) (Anexo A).

626 Foram utilizados 26 ratos *Wistar*, fêmeas adultas jovens, com média de
627 30 semanas de idade e peso variando de 250 a 300g. Foram alojados 3

628 animais em gaiolas de polipropileno, mantidas no Biotério da Pontifícia
629 Universidade Católica do Paraná, sob temperatura constante ($21^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{ C}$),
630 umidade ($70 \pm 10\%$) e luminosidade 12 horas, com acesso livre para água e
631 ração comercial para ratos.

632 Os ratos foram randomizados, identificados um a um e divididos
633 aleatoriamente em dois grupos: Grupo A: 12 animais receberam dois
634 transplantes de placebo, um com sete dias pós-trauma e outro 14 dias pós-
635 trauma (grupo controle negativo). Grupo B: 12 animais receberam dois
636 transplantes nos mesmos períodos pós-trauma, com células tronco derivadas
637 de tecido adiposo humano (hCTDAs). Foram utilizados 2 animais para
638 avaliação das CTDAs *in vivo*. Estes foram submetidos ao mesmo trauma, e
639 receberam 2 transplantes de CTDAs, um com sete dias pós-trauma e outro
640 com 14 dias pós-trauma.

641

642 3.2.2 Indução do Trauma Raquimedular

643

644 Os animais receberam analgesia e anestesia com cetamina
645 (70mg/Kg/IM), xilazina (10mg/kg) e atropina (0,05mg/kg intra peritoneal). A
646 manutenção anestésica foi realizada com isoflurano em circuito anestésico
647 com oxigênio 100%. Foi realizada antibioticoterapia com enrofloxacin
648 (10mg/Kg) por via intramuscular por 3 dias. Para minimizar o edema pulmonar
649 neurogênico decorrente da lesão, foram feitas duas aplicações de furosemida
650 (4mg/kg), sendo uma pré-operatória e outra no pós-operatório imediato.

651 Após a tricotomia ampla do dorso e antissepsia da pele com solução de
652 iodopovidona, uma incisão de 5 cm foi efetuada na linha média dorsal, tendo
653 como referência os processos espinhosos da oitava vértebra torácica (T8) à
654 primeira vértebra lombar (L1). O tecido subcutâneo foi incisado, seguido do
655 afastamento subperiostal da musculatura paravertebral, com uso de lâmina de
656 bisturi n.º 11.

657 A nona e a décima vértebras torácicas (T9 e T10) foram identificadas por
658 meio da contagem dos arcos costais e realizada laminectomia das vértebras
659 torácicas dez (T10) e onze (T11) com alicate de inox. A duramater foi mantida
660 íntegra e a medula espinhal exposta e avaliada sob magnificação para
661 comprovar integridade após a remoção do arco dorsal.

662 Para promover a lesão raquimedular compressiva, um cateter de Fogarty
663 n°3 foi introduzido no espaço epidural e conduzido, cranialmente, até o
664 segmento medular T8-T9. O *cuff* do cateter foi insuflado com 80 µL de solução
665 salina e mantido desta forma por cinco minutos, realizando a compressão
666 raquimedular (Figura 1).

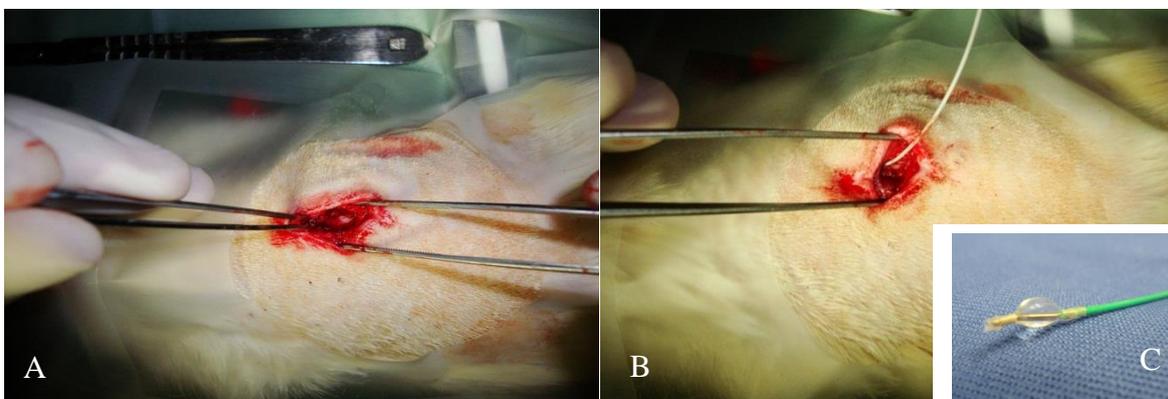
667 Após esvaziamento do *cuff* o cateter foi removido, seguindo-se a
668 aproximação da musculatura e tecido subcutâneo em planos anatômicos com
669 fio vicryl 4-0, em padrão simples contínuo e dermorrafia com mononáilon 3-0,
670 em padrão colchoeiro horizontal contínuo.

671 Os animais foram avaliados 24 horas após o procedimento para
672 observar a presença da paraplegia. Foram incluídos no experimento somente
673 os animais com manifestações simétricas de paraplegia.

674 Após a cirurgia, os animais receberam analgesia com morfina
675 (5mg/Kg/SC), a cada 4 horas, por 3 dias.

676

677 **FIGURA 1.** Indução do trauma raquimedular. Laminectomia dorsal em rato
678 *Wistar* e exposição raquimedular (A). Posicionamento do cateter de Fogarty n°
679 3 (B). Cateter de Fogarty inflado (C).



680 3.2.3 Cultivo de Células-tronco derivadas do Tecido Adiposo Humano

681

682 O tecido adiposo foi obtido de doadores que foram submetidos à cirurgia
683 bariátrica e dermolipectomia. Cerca de 100 mL de tecido adiposo (TA) foram
684 processados. Todas as amostras foram coletadas após o preenchimento do termo
685 de consentimento, que foi enviado ao Comitê de Ética da Pontifícia Universidade
686 Católica do Paraná protocolo nº 04260412.0.0000.0100 (Anexo B).

687 Células-tronco derivadas deste tecido adiposo (CTDAs) foram isoladas
688 utilizando o método de digestão enzimática. Brevemente, 100 mL de tecido
689 adiposo foram lavados com solução salina fosfatada (PBS - Gibco™ Invitrogen,
690 NY, USA) e a digestão foi feita com 1 mg/mL de colagenase tipo I (- Gibco™
691 Invitrogen, NY, USA) durante 30 minutos a 37°C sob constante agitação, seguido
692 por filtração utilizando filtros de 100 e 40 µm (BD FALCON™, BD Biosciences
693 Discovery Labware, Bedford, USA). A suspensão celular foi centrifugada a 800g
694 por 10 minutos e os eritrócitos contaminantes foram removidos após a lise com
695 um tampão pH 7,3.

696 As células foram lavadas e cultivadas numa densidade de 1×10^5
697 células/cm² em frascos de cultura de T75 (TPP, Trasadingen, Switzerland) em
698 meio DMEM-F12 (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) suplementado com 10% de soro
699 bovino fetal (SBF) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), penicilina (100 unidades/mL) e
700 estreptomicina (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) (100 µg/mL). O meio foi trocado
701 dois dias após o plaqueamento inicial. O meio de cultura foi substituído duas
702 vezes por semana. Quando as culturas alcançaram cerca de 80%-90% de
703 confluência, as células foram dissociadas utilizando 0,25% de tripsina/EDTA
704 (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e replaqueadas (passagem 1).

705

706 3.2.4 Viabilidade e Caracterização das CTDAs

707

708 A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante vital Azul de Tripan
709 (Sigma Aldrich, USA), o qual cora as células mortas em azul. Para esta
710 avaliação foi adicionado 10 µL de Azul de Tripan e 50 µL de CTDAs. Em
711 seguida foi feita homogeneização e colocado 10 µL em uma Câmara de
712 Neubauer. Foram avaliados cinco quadrantes na câmara, onde é feita
713 proporção de células coradas em azul e não coradas, sendo que as células-
714 tronco coradas são consideradas inviáveis. Para o primeiro transplante obteve-
715 se uma viabilidade média de 97,5%. Para o segundo transplante obteve-se
716 uma viabilidade média de 98,7%. Foram utilizadas CTDAs entre a terceira e
717 quarta passagens, e a caracterização foi realizada pelo mesmo grupo de
718 pesquisa, conforme descrito por Rebelatto et al. (2008).

719

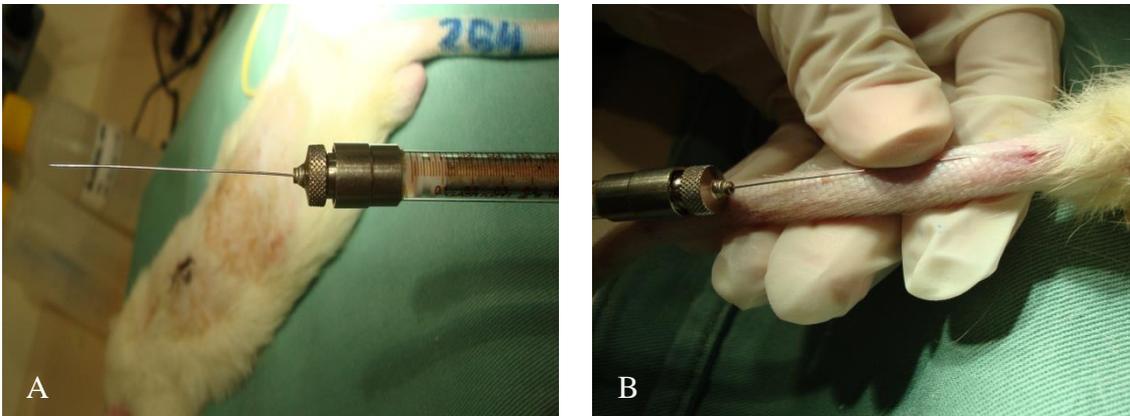
720 3.2.5 Transplante de Células-Tronco Mesenquimais na Veia da Cauda dos
721 Ratos

722

723 As CTDAs foram transplantadas por meio de punção da veia da cauda
724 dos ratos previamente anestesiados de acordo com protocolo descrito. Foi
725 realizada injeção intravenosa de $1,2 \times 10^6$ células, diluídas em 50 μ l de meio de
726 cultura, utilizando-se seringa de Hamilton. A aplicação foi feita de forma lenta, e
727 após aplicação de todo o volume, a agulha foi mantida no vaso por 1 minuto,
728 para evitar o refluxo do conteúdo injetado (Figura 2). Ratos controle receberam
729 apenas 50 μ l do meio de cultura. Foram realizadas duas aplicações, sendo a
730 primeira 7 dias após a lesão, e a segunda 14 dias após a lesão. Ao final do
731 período de 90 dias após a infusão, a medula e suas meninges foram removidas
732 e fixadas para análise por histologia.

733

734 **FIGURA 2.** Transplante de CTDAs na veia da cauda de rato *Wistar*. (A)
735 Seringa de Hamilton utilizada para o transplante. (B) Momento do transplante
736 intravenoso de CTDAs.



737

738 3.2.6 Análise Neuromuscular dos Membros Pélvicos

739

740 Os animais foram avaliados quanto à recuperação de movimentos, por
741 meio de testes físicos, segundo Kuhn e Wrathall (1998), com modificações
742 (Anexo C). Este protocolo atribui pontuações de acordo com o grau de
743 movimento realizado pelo animal em resposta a algum estímulo. Desta forma,
744 foram realizados testes de:

- 745 ✓ coordenação motora em campo aberto, que avalia suporte de peso,
746 flexão do quadril;
747 ✓ extensão reflexa dos dígitos quando o animal é seguro pela cauda;
748 ✓ retirada reflexa dos membros pélvicos em direção ao corpo após
749 extensão manual;
750 ✓ retirada reflexa dos membros em direção ao corpo após estímulo
751 doloroso (picada de agulha);
752 ✓ reflexo para pronar, que avalia tempo de retorno à posição inicial
753 após o animal ser colocado em decúbito dorsal em superfície lisa;
754 ✓ reflexo de agarrar barra com os dígitos após toque de barra de
755 pequeno diâmetro nos membros pélvicos.

756

757 O somatório das pontuações dos ratos de cada tratamento foi
758 comparado entre os tratamentos e entre o tempo de recuperação pós-
759 transplante. Também foram avaliados por meio da avaliação funcional segundo
760 Basso, Beattie and Bresnahan (escala BBB) (Anexo D). As avaliações
761 neuromusculares após contusão da medula espinhal foram realizadas pelo
762 mesmo avaliador, não cego, em campo aberto a cada 15 dias, durante os 90
763 dias, num total de 6 avaliações.

764

765 3.2.7 Avaliação Pós-transplante das CTDAs *in vivo*

766

767 Foram utilizados dois animais, submetidos à LRM, e realizados 2
768 transplantes, sendo o primeiro 7 dias e o segundo 14 dias após a lesão, para o
769 rastreamento *in vivo* das células pós-transplante, com o auxílio do sistema de
770 imagem IVIS Lumina II (Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA, USA) (Figura 3)
771 no qual as células podem ser observadas por bioluminescência e quantificadas.
772 O IVIS Lumina é composto por uma câmara interligada ao *software* Living
773 Image, onde são obtidas as imagens de bioluminescência. Esta câmara
774 também está interligada a um circuito anestésico e de oxigênio. As células 293
775 foram transfectadas com os vetores pMD2.G, pCMV_dr8.91 e
776 pMSCV_Luc2_T2A utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen 11668-027) e
777 foram mantidas durante 3 dias em cultura. O sobrenadante contendo as
778 partículas virais foi coletado, filtrado com filtro de 0,22 µm e ultracentrifugado

779 por 28000 rpm por 1 hora e 30 minutos. Os pellets foram ressuspendidos em
780 PBS/BSA 1%, distribuído em alíquotas de 40µL e estocado a -80°C. As CTDA
781 foram transduzidas com o sobrenadante contendo as partículas virais e
782 10µg/µl de Brometo de Hexadimetrina (Polibreno, Sigma H9268). O meio
783 utilizado para a transdução das células foi trocado a cada 24 horas durante 3
784 dias. Após este período, foi adicionado às células a puromicina (Sigma –
785 P9620), para seleção das células, em uma concentração final de 10Mm. Após
786 o transplante das hCTDAs marcadas, os animais receberam via intra
787 peritoneal, 150mg/kg de Luciferina (substrato da luciferase). Quando a
788 luciferina atinge as hCTDAs marcadas as enzimas luciferases catalisam a
789 oxidação da luciferina, liberando luz, que é detectada pelo equipamento IVIS
790 Luimina, revelando a localização e intensidade das hCTDAs marcadas. Os
791 resultados das imagens foram avaliados utilizando o *software* Living Image.

792

793

794 **FIGURA 3.** Equipamento IVIS Lumina (Caliper LifeSciences, Hopkinton, MA,
795 USA) utilizado para avaliação pós-transplante das CTDA *in vivo* por meio de
796 bioluminescência.



797

798 3.2.8 Avaliação do Padrão Miccional

799

800 A bexiga dos ratos foi esvaziada manualmente 4 vezes ao dia. Foi
801 avaliada a presença de hematúria, retenção ou incontinência urinária.

802

803 3.2.9 Eutanásia dos Animais e Colheita de Material para Histologia

804

805 No 90.^o dia pós-trauma, os 24 animais foram submetidos à eutanásia.
806 Os 2 animais utilizados para avaliação *in vivo* foram eutanasiados 26 dias após
807 o primeiro transplante. Os animais foram anestesiados com cetamina
808 (70mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) e mantidos com isoflurano em circuito
809 anestésico com oxigênio 100%. Imediatamente após identificação de
810 aprofundamento do plano anestésico e parada cárdio-respiratória, foi feita a
811 canulação do ápice do ventrículo esquerdo com agulha fina e pequena incisão
812 na aurícula direita, sendo conectado o sistema de infusão à agulha e infundido
813 o volume de 150 ml de solução salina isotônica seguida de 350 ml de
814 paraformaldeído a 4% gelado. Ao final da infusão foram coletados o segmento
815 medular lesionado e a bexiga dos animais dos grupos A e B.

816

817 3.2.10 Análise Histológica

818

819 Após a eutanásia dos animais dos grupos A e B, a medula e a bexiga
820 foram removidas, formalizadas e emblocadas em parafina. Os cortes têm
821 aproximadamente 4-5 micrômetros de espessura e foram cortados no criostato.
822 Foi utilizada a coloração HE para medula e bexiga, e TM apenas para a bexiga.

823 Após a digitalização das lâminas, foi avaliado o perímetro da medula
824 com *Software* DP2-BSW OLYMPUS.

825 Com relação à bexiga, foram realizados dois cortes histológicos, um do
826 ápice e outro do corpo. Estes cortes foram digitalizados, sendo padronizadas
827 quatro áreas de cada região, para mensuração da espessura da parede
828 vesical. Desta forma obteve-se oito medidas representativas da bexiga de cada
829 animal. Para mensuração da espessura foi utilizado o *Software* IMAGE PRO-
830 PLUS.

831 Além da avaliação da espessura das bexigas, foi realizada avaliação

832 qualitativa, utilizando como critérios a inflamação e a hemorragia para a
833 coloração HE, e deposição de colágeno para a coloração TM. Os parâmetros
834 utilizados para inflamação e hemorragia foram: Presente e ausente. Para a
835 deposição de colágeno foram: Leve, moderado e intenso.

836

837 3.2.11 Análise Estatística

838

839 Os resultados obtidos nos testes neuromusculares foram avaliados na
840 forma de presença ou ausência de cada item (Anexo C e D).

841 Para a avaliação do padrão miccional, foi utilizado o teste Qui-quadrado.
842 Um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

843 O resultado obtido pela marcação das células-tronco com o aparelho
844 IVIS Lumina foi avaliado e apresentado sob a forma de estatística descritiva.

845 Os parâmetros histopatológicos referentes às avaliações da medula e
846 bexiga foram submetidos a análise estatística através do Teste t de Student,
847 presumindo duas variâncias diferentes. Um valor $p < 0,05$ foi considerado
848 significativo.

849 Na avaliação qualitativa da histologia de bexiga foi utilizado o teste Qui-
850 quadrado. Um valor $p < 0,05$ para as variáveis inflamação, hemorragia e
851 colágeno, foram considerados significativos.

852

853 3.3 RESULTADOS

854

855 3.3.1 Mortalidade

856

857 Neste estudo evidenciou-se uma taxa de mortalidade de
858 aproximadamente 42,5%, sendo as principais causas o edema pulmonar
859 neurogênico 30% (n=7) (Figura 4) e a retenção urinária 12,5% (n=3).

860

861

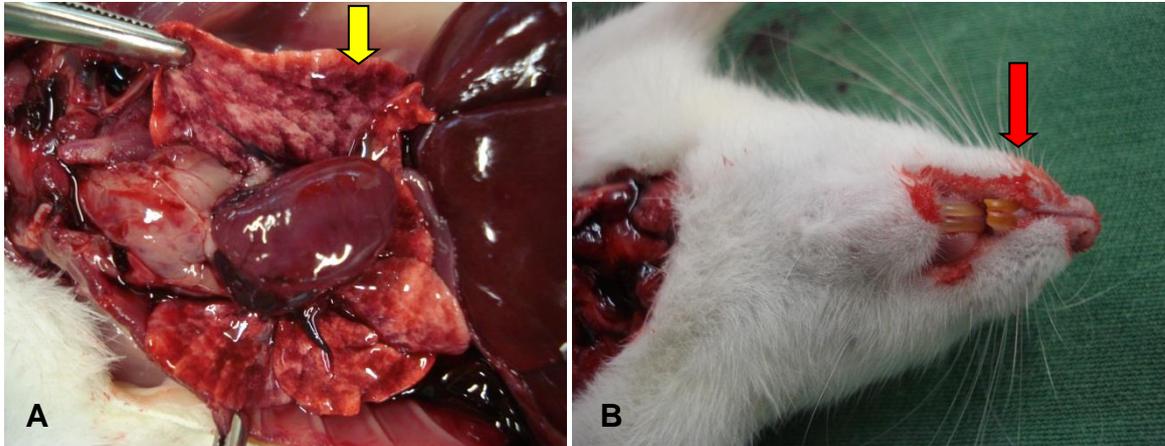
862

863

864

865

866 **FIGURA 4.** Rato *Wistar* com edema pulmonar neurogênico após lesão medular
867 por compressão. (A) Aspecto macroscópico do pulmão apresentando
868 congestão, edema e hemorragia (seta amarela). (B) Presença de epistaxe e
869 hemoptise (seta vermelha).



870
871
872
873

3.3.2 Análise Neuromuscular dos Membros Pélvicos

874 Foram incluídos no estudo apenas animais com paraplegia bilateral,
875 após o trauma raquimedular. Nas seis avaliações realizadas não houve
876 mudanças nas pontuações para os grupos A e B (escore 0 na escala BBB) e
877 nos testes físicos, segundo Kuhn e Wrathall, (1998) (pontuação 0), não sendo
878 evidenciado nenhum movimento dos membros pélvicos nestes grupos.

879

3.3.3 Avaliação Pós-transplante das CTDAs *in vivo*

880
881

882 A avaliação pós-transplante foi realizada em 2 animais. Em um animal
883 foram realizadas cinco avaliações, sendo a primeira no dia do primeiro
884 transplante (D1), 24 horas após o primeiro transplante (D2), no dia do segundo
885 transplante (D7), 24 horas após o segundo transplante (D8) e no dia da
886 eutanásia (D26) (Tabela 1). A intensidade do sinal foi maior nos momentos D7
887 e D8 (Gráfico 1). Observou-se que as células permaneceram no local da
888 aplicação (Figura 5) e também que as células migraram para a região dos
889 pulmões (Figura 6). No segundo animal, somente uma avaliação foi realizada
890 (D1), pois o animal evoluiu para óbito.

891
892

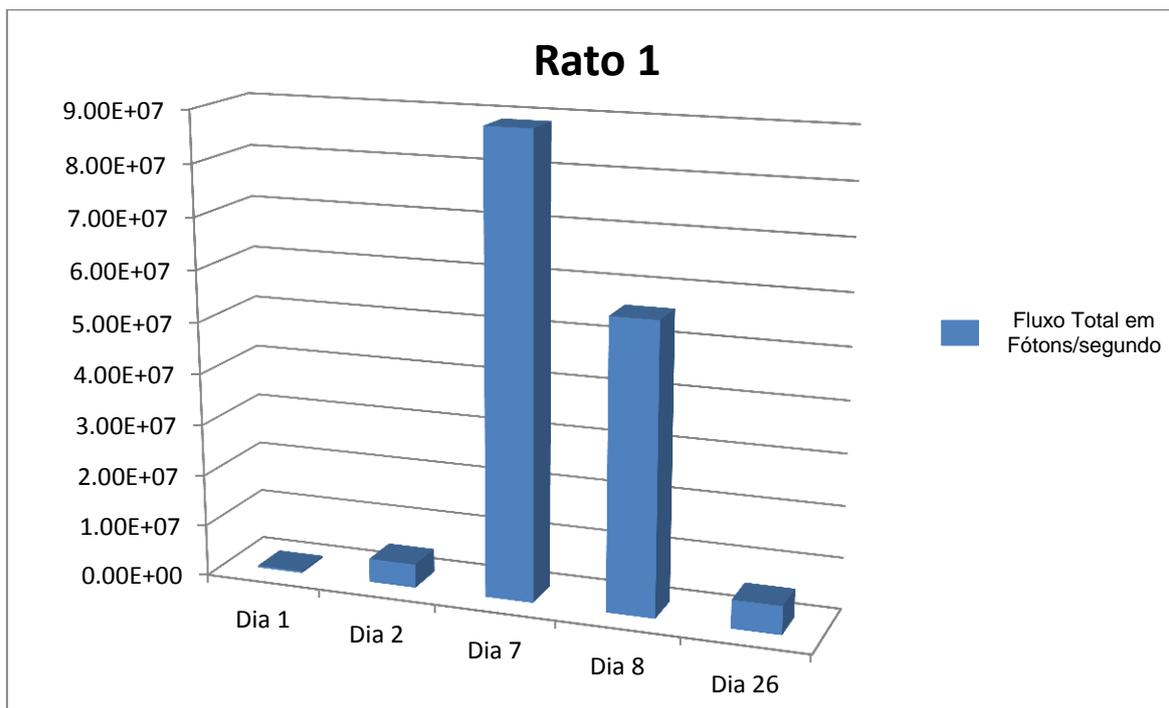
893 **TABELA 1.** Demonstração do Fluxo total em fótons/segundo nos dias das
 894 aplicações das CTDA's marcadas. O Fluxo total se refere à quantidade de
 895 bioluminescência emitida no momento da avaliação.

| Dia da Avaliação | Fluxo total [fótons/segundo] | Número do animal |
|------------------|------------------------------|------------------|
| D1 | 3,52E+05 | 1 |
| D2 | 4,64E+06 | 1 |
| D7 | 8,88E+07 | 1 |
| D8 | 5,61E+07 | 1 |
| D26 | 5,56E+06 | 1 |
| D1 | 5,13E+08 | 2 |

896

897

898 **GRÁFICO 1.** Demonstração do Fluxo total em fótons/segundo do sinal de
 899 bioluminescência. Nota-se um aumento de sinal na segunda aplicação, que
 900 corresponde aos dias 7 e 8.



901

902

903

904

905

906 **FIGURA 5.** Rastreamento da distribuição das CTDAs injetadas no animal 1.
 907 Imagens do rato 1, nos 5 dias de avaliação. Observa-se maior sinal de
 908 bioluminescência nos dias 7 e 8, de acordo com a barra colorimétrica a direita
 909 das imagens.

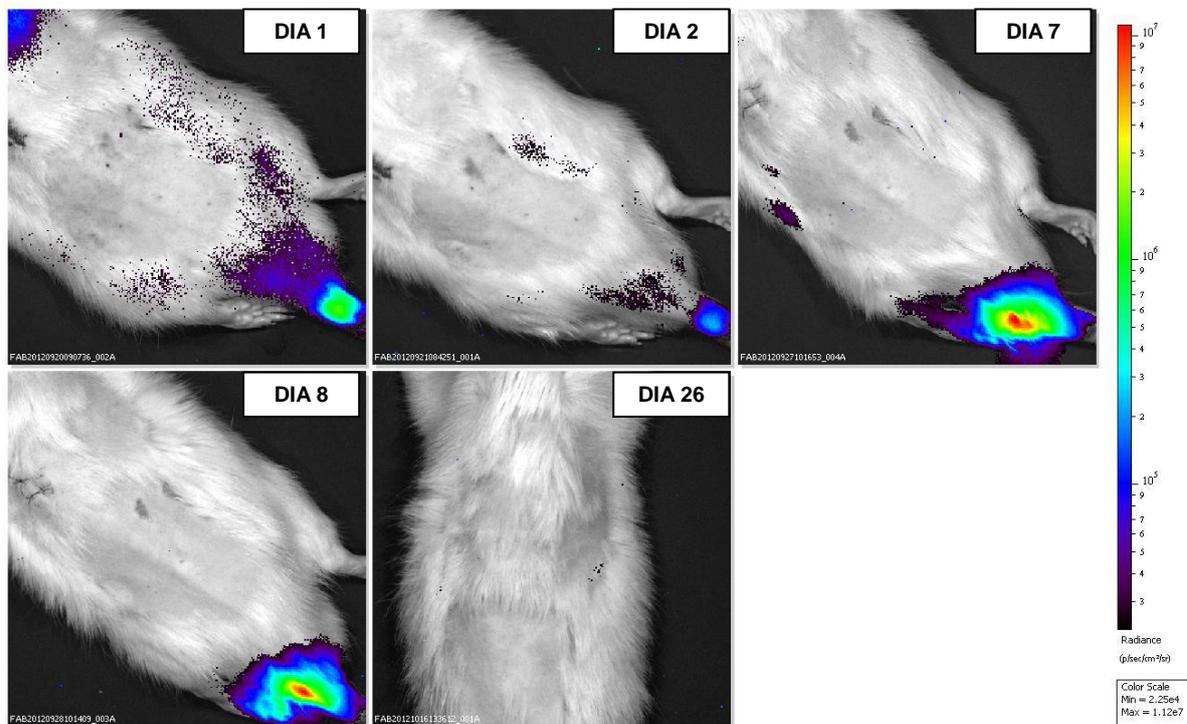
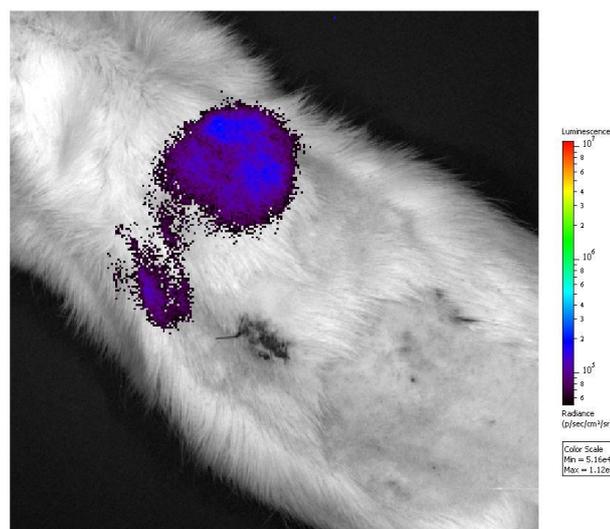


FIGURA 6. Rastreamento da distribuição das CTDAs injetadas no animal 1.
 Animal 1, no dia 1. Observa-se a presença de CTDA marcadas nos pulmões.

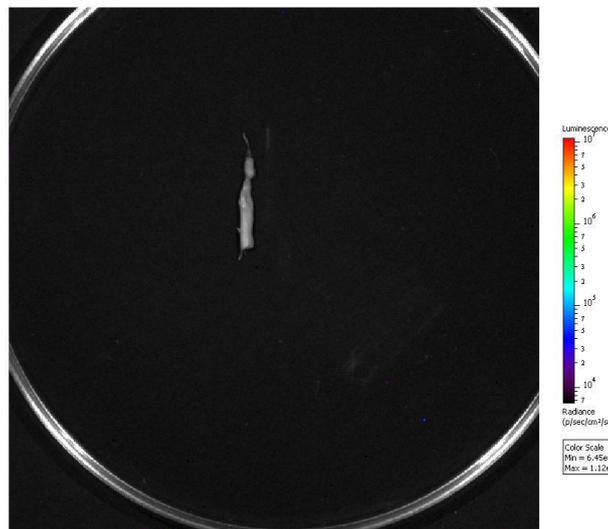


910 As imagens *in vivo* demonstram que as CTDAs transplantadas pela

911 veia caudal se acumularam no local da injeção e nos pulmões, e nenhum sinal
912 foi observado no local da lesão. Após eutanásia do animal 1, o segmento
913 medular lesionado foi coletado, colocado em uma placa, adicionado o
914 substrato Luciferina e em seguida avaliado no equipamento IVIS Lumina. Não
915 foi observado a presença de CTDA's marcadas pela Luciferase no local da LRM
916 (Figura 7).

917

918 **FIGURA 7.** Rastreamento da distribuição das CTDA's injetadas no animal 1
919 após eutanásia. Imagem do segmento medular lesionado adicionado ao
920 substrato Luciferina e avaliado no equipamento IVIS Lumina. Não foi
921 observada a presença de CTDA's marcadas pela Luciferase no local da LRM.



922

923

924 3.3.4 Avaliação do Padrão Miccional

925

926 Após a indução do trauma medular, 100% dos animais manifestaram
927 retenção urinária, sendo observado hematúria macroscópica em 92% (n=22).
928 Em 12,5% dos ratos operados (n=3), foi evidenciada retenção não responsiva à
929 massagem vesical, sugerindo um quadro de obstrução uretral. Após tentativa
930 de esvaziamento vesical por cistocentese, os animais evoluíram para óbito.

931 O débito urinário não foi mensurado, porém notou-se que parte dos
932 animais evoluiu para esvaziamento espontâneo da bexiga, uma vez que a
933 bexiga encontrava-se vazia no momento das massagens vesicais. Esta
934 particularidade foi evidenciada em 83% (n=10) dos animais do grupo B, em

935 média 8 dias após a segunda aplicação de células tronco. Somente 17% (n=2)
936 dos animais do Grupo A apresentaram esvaziamento espontâneo vesical. Por
937 meio da avaliação estatística Qui quadrado é possível afirmar que os animais
938 do grupo B apresentaram um retorno de micção diferente e superior
939 comparativamente ao grupo A ($p = 0,01$). Os demais animais de ambos os
940 grupos apresentaram incontinência paradoxal, sendo necessário esvaziamento
941 vesical durante todo o período do estudo.

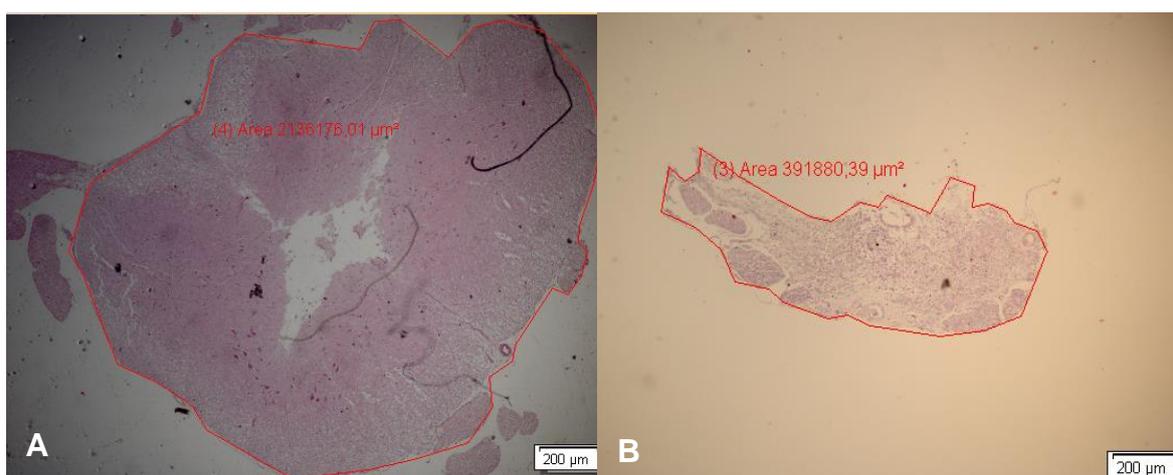
942

943 3.3.5 Análise Histológica

944

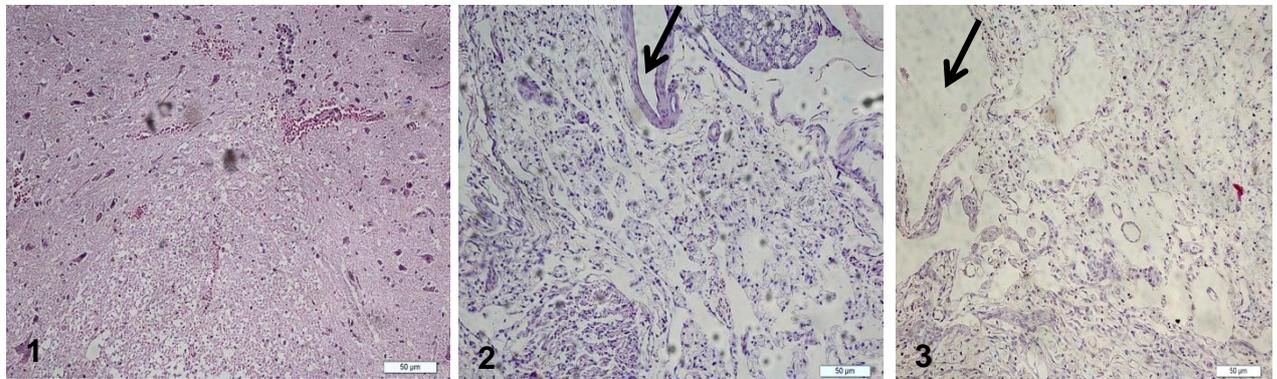
945 Os segmentos da medula mensurados em micrômetros (μm) foram
946 analisados e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as
947 médias dos Grupos A ($753,43 \mu\text{m}$) e B ($794,31 \mu\text{m}$) $p= 0,77$. A análise
948 histológica de ambos demonstrou espaçamentos em substância branca,
949 compatíveis com áreas de necrose (Figura 9). Quando a medula dos 24
950 animais operados foi comparada a medida da medula normal, notou-se
951 diferença estatística entre estes segmentos (A $p= 0,00$; B $p = 0,00$) (Figura 8).

952 **FIGURA 8-** Cortes histológicos utilizados para mensurar o perímetro da
953 medula. Imagem de uma medula normal e sua respectiva medida (em
954 vermelho) (A). Imagem de uma medula de um animal do grupo B e sua
955 respectiva medida (em vermelho) (B). (Coloração H.E. Aumento 40x).



956

957 **FIGURA 9-** Aspecto histológico do corte transversal de medula espinhal normal
958 (1). Grupo A (2) e Grupo B (3) apresentando espaçamentos na substância
959 branca (setas) compatíveis com área de necrose. (Coloração H.E. Aumento
960 200x).



961

962 Com relação aos cortes vesicais, as médias das oito medidas obtidas
963 em cada lâmina foram avaliadas e comparadas, não sendo observada
964 diferença estatística entre os grupos A e B ($p = 0,55$). Quando a bexiga dos 24
965 animais operados foi comparada à medida da bexiga normal, não se notou
966 diferença estatística entre estes cortes A ($p = 0,03$); B ($p = 0,01$). Na avaliação
967 qualitativa das bexigas, também não se observou diferença entre os grupos A e
968 B, com o corte histológico de uma bexiga normal (Figura 10), e na avaliação
969 estatística não foi observada diferença significativa entre os grupos A e B para
970 as variáveis inflamação ($p = 1,00$), hemorragia ($p = 1,00$) e colágeno ($p = 0,45$)
971 (Tabela 2).

972

973 **FIGURA 10** – Corte histológico de bexiga normal (1), grupo A (2) e grupo B (3).
 974 Aspecto histológico de cortes transversais de bexiga exibindo aspectos de
 975 normalidade (Coloração TM. Aumento 100x).



976

977 **TABELA 2** – Avaliação histológica qualitativa da bexiga dos grupos A e B. Na
 978 coloração HE foi avaliada inflamação e hemorragia. Na coloração TM avaliou-
 979 se fibras colágenas.

980

| | GRUPO A | | | GRUPO B | | | | |
|-----------|----------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|-------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|
| | RATO | HE INFLAMAÇÃO | HEMORRAGIA | TM COLÁGENO | RATO | HE INFLAMAÇÃO | HEMORRAGIA | TM COLÁGENO |
| 1 | | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 2 | | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| 3 | | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 1 |
| 5 | | 0 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | | 0 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 1 |
| 7 | | 0 | 0 | 1 | 7 | 0 | 0 | 1 |
| 8 | | 0 | 0 | 1 | 8 | 0 | 0 | 1 |
| 9 | | 0 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 1 |
| 10 | | 0 | 0 | 1 | 10 | 0 | 0 | 1 |
| 11 | | 0 | 0 | 2 | 11 | 0 | 0 | 2 |
| 12 | | 0 | 0 | 1 | 12 | 0 | 0 | 1 |

981

HE: PRESENTE (1); AUSENTE (0). TM: LEVE (1); MODERADO(2); INTENSO(3).

982

983

984

985

986

987

988 3.4 DISCUSSÃO

989

990 Para produzir lesão medular experimental em ratos, diversos métodos
991 podem ser utilizados, dentre eles a impactação por peso (New York University
992 (NYU) Spinal Cord Contusion system – IMPACTOR) (Meyer et al., 2003). Há
993 outros métodos como a transecção ou hemiseção da medula (Nakae et al.,
994 2011) e o modelo escolhido para este experimento, que consiste na
995 compressão da medula, após laminectomia, por meio de um cateter Fogarty nº
996 3. Tarlov et al., (1953), introduziram a técnica de compressão medular em
997 cachorros por implantação de um balão inflável no espaço extradural. O
998 desenvolvimento de balões infláveis menores tornou possível estudar animais
999 de laboratório (Rivlin e Tator, 1978). Leal Filho et al. (2005) e Sedy et al. (2009),
1000 utilizaram o modelo experimental com cateter mais fino, menor insuflação do
1001 balão e menor tempo de compressão, para avaliar edema pulmonar
1002 neurogênico em ratos. Neste estudo, o método de compressão com cateter de
1003 Fogarty nº 3 inflado com 80 µL e mantido por 5 minutos, foi eficiente para
1004 produzir lesão medular e paraplegia bilateral em ratos, pois não foram
1005 verificadas variações motoras e o quadro após recuperação anestésica (escala
1006 BBB 0) foi mantido até o dia da eutanásia.

1007 Villanova et al. (no prelo) realizaram compressão medular por meio do
1008 cateter de Fogarty nº 3, com 50 µL e 80 µL, durante 5 minutos. Os autores
1009 concluíram que a compressão de 80µL para insuflar o balão do cateter foi mais
1010 eficiente, apesar da maior porcentagem de mortalidade, pois resultou em
1011 paraplegia em todos os animais e não houve melhora espontânea progressiva.

1012 Ratos são uma boa alternativa, segundo a literatura, em razão das
1013 características patológicas da sua medula espinhal, e estudos utilizando a
1014 técnica do impacto, afirmam que o rato é uma espécie válida para o estudo
1015 experimental da lesão medular (Black et al., 1986).

1016 A principal causa de mortalidade trans-operatória encontrada neste
1017 experimento foi o edema pulmonar. Segundo Leal filho et al. (2005a), em
1018 pacientes com lesões na medula espinhal, as complicações respiratórias ainda
1019 são um cofator importante de morbidade e mortalidade. O edema pulmonar
1020 neurogênico é caracterizado como um edema pulmonar agudo, rico em
1021 proteínas e que ocorre logo após a lesão medular. No entanto, a incidência,

1022 fisiopatologia e significância clínica permanecem obscuras (Schwarz et al.,
1023 1997). O desenvolvimento de edema pulmonar neurogênico parece basear-se
1024 na hiperatividade do sistema simpático, por meio de uma grave descarga
1025 simpática, também chamada de tempestade de catecolaminas (Dragosavac et
1026 al., 1997; Fontes et al., 2003; Leal Filho et al., 2005a; Leal Filho et al., 2005b).

1027 Observou-se que animais mais jovens, com cerca de 20 semanas de
1028 vida, sofriam de edema pulmonar com maior frequência do que os mais velhos,
1029 com 30 semanas em média. Não se constatou em literatura nenhuma citação
1030 sobre a idade dos animais relacionada à maior incidência de edema pulmonar
1031 neurogênico. Uma condição que pode estar relacionada a esta observação é a
1032 imaturidade pulmonar e o menor diâmetro do canal medular dos animais mais
1033 jovens. O suporte respiratório é um importante ponto terapêutico no edema
1034 pulmonar neurogênico (Leal Filho et al., 2005b), sendo por isso todos os
1035 animais do presente estudo mantidos em oxigenioterapia no trans e pós-
1036 operatório imediato.

1037 Com relação à utilização das CTDA's, no presente estudo optou-se pela
1038 aplicação intravenosa. Segundo Barbash et al. (2003), a via intravenosa é, sem
1039 dúvida, a menos invasiva. Embora seja considerada uma via fácil e segura, a
1040 captura das células transplantadas em outros órgãos e a exposição a uma
1041 reação imune limita sua utilidade clínica, além de existir uma preocupação em
1042 relação a sua eficácia. Porém, Mahmood et al. (2003) realizaram aplicação de
1043 CTMs na veia da cauda de ratos com trauma cerebral e observaram melhora
1044 significativa nos resultados funcionais, constatando também a migração das
1045 células, preferencialmente localizadas ao redor do local da lesão. Outra
1046 observação importante acerca do local do transplante foi feita por Beck et al.
1047 (2010), ao relatar que a presença de células fagocíticas no local da lesão
1048 sugere que o epicentro pode não ser um local com ambiente favorável para a
1049 sobrevivência das células tronco. Consideramos a via intravenosa menos
1050 invasiva e de fácil utilização, evitando o sítio inflamatório instalado na região da
1051 medula lesionada e disponibilizando um maior volume de células
1052 transplantadas para migrarem para este local. Ainda é relevante ressaltar que
1053 esta via de aplicação não foi explorada na terapia celular em trauma medular,
1054 justificando a necessidade de novas pesquisas.

1055 A ocorrência de distúrbio miccional associado ao trauma medular é bem
1056 documentada na literatura (Forner, 2011) e pode-se notar que todos os animais
1057 do presente estudo apresentaram retenção urinária pós-lesão. O esvaziamento
1058 incompleto e a progressiva diminuição da complacência da parede da bexiga
1059 são os principais fatores de infecção do trato urinário em pacientes com lesão
1060 medular. A estase urinária atua como um meio para o crescimento bacteriano e
1061 hipertrofia detrusora, com conseqüente deposição de colágeno entre suas
1062 fibras (Landau et al., 1994), comprometendo a complacência vesical. A baixa
1063 complacência da parede da bexiga também predispõe para infecção do trato
1064 urinário superior (pielonefrite) e urosepse, ao criar estase que afeta todo o trato
1065 urinário (Gray, 2006).

1066 Para evitar tais complicações, os animais foram submetidos a quatro
1067 massagens vesicais diárias. Porém, em 12,5% dos ratos (três animais) foi
1068 evidenciada retenção não responsiva à massagem vesical. Nos animais que
1069 não responderam ao estímulo manual para esvaziamento vesical, optamos
1070 pela realização da cistocentese. Após tentativa de esvaziamento vesical por
1071 cistocentese, os animais evoluíram para óbito, sendo que este método
1072 demonstrou não ser uma alternativa segura na presença de hiperdistensão
1073 vesical.

1074 É esperado que a quantidade total de colágeno aumente durante o
1075 processo de hipertrofia detrusora e retenção que acompanha os quadros de
1076 bexiga neurogênica, caracterizando bexigas fibróticas e pouco complacentes.
1077 Porém, Uvelius e Mattiasson (1984) não relataram diferenças na quantidade de
1078 colágeno da bexiga de ratos após diferentes períodos de desnervação vesical.
1079 Semelhante ao nosso estudo, não observamos diferenças significativas entre a
1080 quantidade de colágeno da bexiga dos animais de ambos os grupos. Com
1081 relação à hipertrofia, as médias das oito medidas obtidas em cada lâmina
1082 foram avaliadas e comparadas, não sendo observada diferença estatística
1083 entre os grupos A e B. Quando a bexiga dos 24 animais operados foi
1084 comparada a medida da bexiga normal, não houve diferença estatística entre
1085 estes cortes. O baixo índice de alterações histológicas na bexiga dos ratos
1086 pode ser atribuído às constantes massagens para esvaziamento vesical e
1087 conseqüente baixo volume residual, contribuindo para o menor índice de
1088 infecção, hipertrofia e fibrose. Entretanto, estudos urodinâmicos e culturas de

1089 urina poderiam esclarecer com maior embasamento os achados aqui descritos.

1090 Notou-se ainda que parte dos animais evoluiu para esvaziamento vesical
1091 espontâneo, uma vez que a bexiga encontrava-se vazia no momento das
1092 massagens vesicais. Esta particularidade foi evidenciada em 83% dos animais
1093 do grupo B, em média 8 dias após a segunda aplicação de células-tronco,
1094 enquanto que somente 17% dos animais do Grupo A apresentaram
1095 esvaziamento vesical espontâneo. Os demais animais de ambos os grupos
1096 apresentaram incontinência paradoxal, sendo necessário esvaziamento vesical
1097 durante todo o período do estudo. Estes resultados indicam que o transplante
1098 de hCTDAs em ratos com LRM pode ser associado a uma melhora na retenção
1099 / incontinência urinária. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos
1100 que comprovem a eficácia das células tronco na recuperação do reflexo
1101 miccional. É possível que este efeito esteja relacionado ao fato das CTMs
1102 secretarem uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que possuem
1103 atividade tanto parácrina como autócrina. Acredita-se que essa propriedade
1104 seja de fundamental importância para a explicação dos efeitos terapêuticos
1105 observados com essas células. Esses fatores secretados pelas CTMs exercem
1106 ação antiapoptótica, pró-angiogênica e efeito reparador endógeno (Gnecchi et
1107 al., 2008). Além disso, a isquemia aumenta a produção de diversos fatores, tais
1108 como fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento de
1109 fibroblasto básico, fator de crescimento dos hepatócitos, fator de crescimento
1110 insulina-like e adrenomedulina (Yon et al., 2005; Nagaya et al., 2005).

1111 Além do efeito das CTMs, a recuperação da função vesical relaciona-se
1112 com a capacidade de reorganização das vias medulares e a neuroplasticidade
1113 mediada por fatores de crescimento. Forner (2011) relata que a recuperação da
1114 atividade reflexa da bexiga urinária após a lesão medular depende da
1115 reorganização das vias medulares e alteração nas propriedades dos neurônios
1116 eferentes parassimpáticos, simpáticos e somáticos bem como das fibras
1117 aferentes da bexiga urinária.

1118 Apesar da importante observação acerca da atividade miccional, no
1119 presente estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa entre
1120 os grupos A e B quanto a histologia de medula. A análise histológica de ambos
1121 demonstrou espaçamentos em substância branca, compatíveis com áreas de

1122 necrose. Quando a medula dos 24 animais operados foi comparada a medida
1123 da medula normal, notou-se diferença estatística entre estes segmentos.

1124 Nas seis avaliações neuromusculares realizadas não houve mudanças
1125 nas pontuações para os grupos A e B (escore 0 na escala BBB), não sendo
1126 evidenciado nenhum movimento dos membros pélvicos nestes grupos. Este
1127 resultado, aliado aos encontrados na histologia da medula corroboram com os
1128 estudos de Bresnahan et al., (1987), Behrmann et al., (1992) e Basso et al.,
1129 (1995), que relacionam os achados motores aos histológicos, onde comprovam
1130 que a porcentagem de tecido medular disponível está estreitamente ligada à
1131 recuperação motora.

1132 Prevalece então a evidência científica de que a aplicação local de
1133 células-tronco pode apresentar um efeito terapêutico mais eficaz nas lesões
1134 medulares. Lee et al., 2007 aplicaram CTM de medula óssea de humanos em
1135 ratos com LRM e observaram uma melhora funcional, de acordo com testes
1136 comportamentais (BBB), testes eletrofisiológicos e imunohistoquímica. Ryu et
1137 al. (2012) transplantaram células tronco mesenquimais cranial e caudalmente
1138 ao local da lesão medular experimental em cães e observaram significativa
1139 melhora na locomoção 8 semanas após a aplicação, além de relatarem
1140 importantes indícios de regeneração neuronal e diminuição do tamanho da
1141 lesão na histologia. Estes autores ressaltam a necessidade de evitar o
1142 epicentro da lesão, conforme já descrito por Beck et al. (2010) acerca da
1143 dificuldade de sobrevivência das células transplantadas no local inflamado.

1144 Em nosso estudo, a avaliação dos dois animais por meio da
1145 bioluminescência permitiu observar que as células permaneceram no local da
1146 aplicação e também migraram para os pulmões. Barbash et al. (2003)
1147 ressaltam que, na via intravenosa pode ocorrer o acúmulo de CTMs no interior
1148 dos órgãos que atuam como filtros, tais como pulmão, fígado e baço. Estes
1149 achados corroboram com os resultados obtidos por Harting et al. (2009), que
1150 realizaram aplicação intravenosa de CTMs em animais que sofreram trauma
1151 crânio encefálico experimental, e mais de 96% das células injetadas ficaram
1152 presas no pulmões e não atingiram a circulação. O autor classificou esta
1153 ocorrência como um fenômeno designado por "efeito de primeira passagem
1154 pulmonar". Devine et al. (2003) avaliaram a distribuição das CTMs em outros
1155 órgãos após infusão venosa. Esses autores marcaram as CTMs com uma

1156 proteína verde fluorescente e infundiram essas células em babuínos. As
1157 células-tronco foram detectadas em diversos tecidos, como rim, pele, pulmão,
1158 timo e fígado, com nível de fixação variando entre 0,1% e 2,7%. Wang et
1159 al.(2012) realizaram transplante de CTMs na veia da cauda de ratos, e
1160 observaram por meio de bioluminescência que as células permaneceram em
1161 órgãos como pulmão, fígado e baço, durante pelo menos sete dias após o
1162 transplante. Estes dados reforçam a teoria de que as CTMs participam da
1163 reposição celular em uma variedade de tecidos, preferencialmente em tecidos
1164 que sofreram injúria. No presente estudo, em relação às células identificadas
1165 no local da infusão, é possível que tenham extravasado do vaso no momento
1166 da aplicação, permanecendo no tecido subcutâneo. Uma alternativa para evitar
1167 esta ocorrência em estudos futuros é a realização de dissecação do vaso por
1168 meio de flebotomia para em seguida realizar a infusão intravenosa.

1169 A migração das células para os pulmões também pode ser atribuída ao
1170 efeito *Homing*, pois após TRM os animais apresentavam severo edema
1171 pulmonar neurogênico. Segundo Karp e Leng Teo (2009), *Homing* é definido
1172 como a captura das células-tronco mesenquimais pela vasculatura de um
1173 tecido, seguido de sua transmigração através do endotélio. Embora esse
1174 processo ainda não esteja totalmente esclarecido, muito se tem investigado a
1175 respeito da mobilização de células-tronco mesenquimais nativas e do *homing*
1176 das células-tronco mesenquimais exógenas infundidas por diversas vias em
1177 resposta a um insulto isquêmico/inflamatório.

1178

1179 3.5 CONCLUSÃO

1180

1181 A compressão medular por meio do cateter Fogarty nº 3 inflado com 80µl
1182 mostrou-se eficaz para produzir paraplegia em ratos *wistar*, e a principal
1183 complicação observada neste estudo foi o edema pulmonar neurogênico.

1184 Os dados desta pesquisa sugerem que o transplante de células-tronco
1185 mesenquimais de tecido adiposo humano (hADSC) pode estar associado a
1186 recuperação da continência urinária em ratos submetidos ao trauma
1187 raquimedular.

1188

1189

CAPITULO 4

4 CONCLUSÃO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de regeneração das lesões raquimedulares em ratos submetidos à terapia com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano, por via intravenosa.

Observamos que 83,3% dos animais que receberam células-tronco apresentaram recuperação na continência urinária. Entretanto não houve regeneração no local da lesão, e consequente ganho na avaliação neuromuscular.

Para reforçar esta teoria, estudos relacionando o mesmo protocolo de lesão e tratamento utilizados neste experimento podem ser associados à mensuração da produção urinária, por meio de estudos urodinâmicos e cultura de urina.

A principal complicação no trans operatório foi o edema pulmonar neurogênico. Para estudos futuros, uma proposta é avaliar a relação entre a idade dos animais, diâmetro do canal medular e o edema pulmonar neurogênico.

Uma proposta para disponibilizar células para o local da lesão, além daquelas que se depositam em órgãos como fígado, baço e pulmões, seria aumentar o volume de células transplantadas. Em relação à permanência das células no local da aplicação, sugerimos para estudos futuros a realização de flebotomia prévia ao transplante.

REFERÊNCIAS

1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257

Andersson KE, Arner A. Urinary Bladder Contraction and Relaxation: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2004; 84: 935-986.

Arias MVB, Severo M S, Tudury E A. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. *Ciências Agrárias*. 2007; v. 28, n. 1, p. 115-134.

Barbash I, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003; 108(7):863-868.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma*. 1995; 12: 1-21.

Barros SVG, Del Carlo RJ, Vilorio MIV, Galvão Filho SR. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. *Ciência Rural*. 2001; v.31, p.627-632.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*. 2002; v.30, n.1, p. 42-48.

Behrmann D.L., Bresnahan J.C., Beattie M.S., Shah B.R.: Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats. *Journal of Neurotrauma*. 1992; 9: 197-217.

Beck K D, Nguyen H X, Galvan M D, Salazar D L, Woodruff T M, Anderson A J. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury:evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*. 2000; 133: 433-447.

1258 Bergman R, Lanz O, Shell L. A review of experimental and clinical treatments
1259 for acute spinal cord injury. *Veterinary Medicine*. 2000; p.855-866.
1260

1261 Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APE, Deffune
1262 E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. *Acta*
1263 *Ortopédica Brasileira*. 2006; v.14 n.1, p22-24.
1264

1265 Black P, Markowitz MA, Cooper V, Mechanic A, Kushner H, Damjanov I.
1266 Models of spinal cord injury: part I - Static load technique. *Neurosurgery*.
1267 1986;19:752-62.
1268

1269 Branco E, Carvalho AF, Fioretto ET, Cabral R, Gregores GB, Ferreira GJ,
1270 Sarmiento CAP, Samoto VY, Balieiro CC, Miglino MA. Quantificação Atrial de
1271 Células Mononucleares de Medula Óssea (CMMO) infundidas via
1272 intrapericárdica em suínos submetidos a infarto agudo do miocárdio. *Acta*
1273 *Veterinária Brasileira*. 2009; v.3, n.2, p. 77-83.
1274

1275 Braund, Kyele G. *Clinical syndromes in veterinary neurology*. 2. ed. St. Louis,
1276 Missouri: Mosby, 1994.
1277

1278 Bresnahan JC, Beattie MS, Tod III FD, Noyes DH. A behavioral and anatomical
1279 analysis of spinal cord injury produced by a feedbackcontrolled impact device.
1280 *Experimental Neurology*. 1987; 95: 548-570.
1281

1282 Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of*
1283 *Pathology*. 2009; v.217, p.318-324.
1284

1285 Chehrazi BB, Scremin O, Decima EE. Effect of regional spinal cord blood flow
1286 and central control in recovery from spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*.
1287 1989; 71: 747-53.
1288

1289 Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, Sun Y,
1290 Jacquin MF, Johnson EM, Holtzman DM. Caspase inhibitor affords
1291 neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-

1292 ischemic brain injury. The Journal of Clinical Investigation. 1998; v.101, n.9,
1293 p.1992-1999.
1294

1295 Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside
1296 GM1 on acute spinal cord injury in rats. Journal of Neurosurgery. 1994;
1297 80(1):97-111.
1298

1299 De Groat W, Yoshimura N. Mechanisms underlying the recovery of lower
1300 urinary tract function following spinal cord injury. In: Progress in Brain
1301 Research. Elsevier: Amsterdam. 2006; p 59-83.
1302

1303 De Groat W, Yoshimura N. Changes in afferent activity after spinal cord injury.
1304 Neurology and Urodynamics, 29:63-76, 2010.
1305

1306 Defino HLA. Trauma Raquimedular. Anais In: Simpósio Trauma 2; 1999;
1307 Ribeirão Preto, Brasil.p.388-400.
1308

1309 Del Carlo RJ. Células-tronco: células da esperança. Conselho Federal de
1310 Medicina Veterinária. 2005; v.11, n.35, p60-68.
1311

1312 Del Carlo RJ, Monteiro BS, Argolo Neto NM. Avanços no estudo de células-
1313 tronco no Brasil e suas implicações. Ceres. 2009; v.56, p.446-450.
1314

1315 Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal
1316 stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion in to
1317 nonhuman primates. Blood. 2003;101(8):2999-3001.
1318

1319 Dewey CW. Mielopatias: Doenças da medula espinhal. In: DEWEY CW.
1320 Neurologia de cães e gatos: guia prático. 1 ed. São Paulo: Roca; 2006. Cap. 9,
1321 p. 163-195.
1322

1323 Dragosavac D, Falcao ALE, Araújo S, Terzi RGG. Neurogenic pulmonary
1324 edema: report of two cases. Arquivos de Neuropsiquiatria. 1997; 55: 305-309.
1325

1326 Fonte N. Cuidado Urológico do Paciente com Lesão da Medula Espinhal. J
1327 Wound Ostomy Continence Nurs. 2008; 35(3):323-331.
1328

1329 Fontes RB, Aguiar PH, Zanetti MV, Andrade F, Mandel M, Teixeira MJ. Acute
1330 neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. Journal of
1331 Neurosurgical Anesthesiology. 2003; 15: 144-150.
1332

1333 Forner S. Envolvimento dos receptores b1 e b2 para as cininas na
1334 hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular em ratos.
1335 (dissertação de mestrado) Florianópolis, SC: UFSC, 2011.
1336

1337 Fowler CJ, Griffiths D, De Groat W. The neural control of micturition. Nature
1338 Reviews Neuroscience. 2008; 9:453-466.
1339

1340 Franchini KG, Crosara A, Daniela P. Regeneração miocárdica por células-
1341 tronco ou células musculares periféricas: Onde estamos? Revista da
1342 Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. 2002; v.12, n.3.
1343

1344 Fry CH, Meng E, Young JS. The physiological function of lower urinary tract
1345 smooth muscle. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical. 2010; 154: 3-13.
1346

1347 Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science. 2000; v.287, p.1433-1438.
1348

1349 Gangji V, Hauzeur JP, Matos, C, Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M.
1350 Implante de Células Mononucleares Autólogas de Medula Óssea é Tratamento
1351 Seguro e Eficaz para Estágios Precoces de Osteonecrose da Cabeça Femoral.
1352 The Journal of Bone and Joint Surgery. 2004; v.86, p.1153-1160.
1353

1354 Gebrin A, Cunha AS, Silva CF. Perspectivas de recuperação do lesado
1355 medular. Revista Brasileira de Ortopedia. 1997; v. 32, n. 2, p. 103-108.
1356

1357 Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell
1358 signaling and therapy. Circulation Research. 2008; 103(11):1204-1219.
1359

1360 Gray M. Pathophysiology and management of reflex incontinence/ neurogenic
1361 bladder. In: Doughty D. Urinary and Fecal Incontinence. St Louis, MO: Mosby;
1362 2006. p.187–223.
1363

1364 Haas SJ, Bauer P, Rolfs A, Wree A. Immunocytochemical characterization of in
1365 vitro PKH26-labelled and intracerebrally transplanted neonatal cells. Acta
1366 Histochemica. 2000; 102:273-277.
1367

1368 Hall ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do build on
1369 past success? The Journal of Spinal Cord Medicine. 2001; 24(3):142-146.
1370

1371 Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS.
1372 Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. Journal
1373 of Neurosurgery. 2009; 110(6), 1189-1197.
1374

1375 Herzog, EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood,
1376 v.102, p.3483-3493, 2003. Disponível em:
1377 <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/102/10/3483>>. Acesso
1378 em: 10 mar. 2012.
1379

1380 Janssens, L A A. Therapeutic aspects of acute spinal cord trauma. Journal of
1381 Small Animal Practice.1986; v.32, p. 620-626.
1382

1383 Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the
1384 details. Cell Stem Cell. 2009;4(3):206.
1385

1386 Kern S, Eichler H, Stoeve J, KluTer H, Bieback K. Comparative analysis of
1387 mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose
1388 tissue. Stem Cells. 2006; 24:1294–1301.
1389

1390 Kima YJ, Kima HK, Choa HH, Baed YC, Suhe KT, Junga JS. Direct
1391 Comparison of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissues
1392 and Bone Marrow in Mediating Neovascularization in Response to Vascular
1393 Ischemia. Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of

1394 Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology. 2007;
1395 20:867-876.
1396
1397 Kraus KH, Kirked-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration.
1398 Veterinary Surgery. 2006; v.35, p.232-242.
1399
1400 Kwon BK, Mann C, Sohn HM, Hilibrand AS, Phillips FM, Wang JC, Fehlings
1401 MG. Hypothermia for spinal cord injury. The Spine Journal. 2008; v. 8, p.859–
1402 874.
1403
1404 Landau EH, Jayanthi VR, Churchill BM, Shapiro E, Gilmour RF, Khoury AE,
1405 Macarak EJ, Mclorie GA, Steckler RE, Kogan BA. Loss of elasticity in
1406 dysfunctional bladders: Urodynamic and histochemical correlation. Journal of
1407 Urology.1994; v.152, p.702-705.

1408 Leal Filho MB, Morandin RC, De Almeida AR, Cambiucci EC, Metze K, Borges
1409 G, Gontijo JA. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema
1410 following spinal cord injury: an experimental model. Arquivos de
1411 Neuropsiquiatria. 2005a; 63: 990-996.
1412
1413 Leal Filho MB, Morandin RC, De Almeida AR, Cambiucci EC, Metze K, Borges
1414 G, Gontijo JA. Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic
1415 pulmonary edema in spinal cord injury. Neuroscience Letters. 2005b; 373: 165-
1416 170.
1417
1418 Lecouteur R A, Grandy JL. Doenças da Medula Espinhal. In: Ettinger SJ,
1419 Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 5. ed., São Paulo:
1420 Manole; 2005. v. 1, Cap. 106, p. 644-694.
1421
1422 Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi H, Suh K, Bae YC. Jung, J.S.
1423 Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from
1424 human bone marrow and adipose tissue. Cellular Physiology and Biochemistry:
1425 International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and
1426 Pharmacology. 2004; 14:311-324.

1427 Lee KH, Suh-Kim H, Choi JS, Jeun SS, Kim EJ, Kim SS, Yoon DH, Lee BH.
1428 Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery
1429 following acute spinal cord injury in rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*.
1430 2007; 67: 13-22.
1431
1432 Lianza S, Casalis ME, Greve JMD, Eichberg R. A lesão medular. In: *Medicina*
1433 *de Reabilitação*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2001. p. 299-322.
1434
1435 Lorenz MD, Kornegay JN. *Neurologia Veterinária*. 4 ed. Barueri, SP: Manole;
1436 2006.
1437
1438 Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult
1439 rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells.
1440 *Neurosurgery*, 2003; 53(3), 697-702, discussion 702-693.
1441
1442 Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in
1443 virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. 2006; v.119,
1444 p.2204-2213.
1445
1446 Meyer F, Vialle LR, Vialle EN, Bleggi-Torres LF, Rasera E, Leonel I. Alterações
1447 vesicais na lesão medular experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*.
1448 2003; v. 18, n. 3, p. 203-208.
1449
1450 Monteiro BS, Argolo Neto NM, Del Carlo RJ. Células-tronco mesenquimais:
1451 uma breve revisão. *Ciência Rural*. 2009; v.40, n.1, p. 238-245.
1452
1453 Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y.
1454 Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat
1455 model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112(8):1128-35.
1456
1457 Nakae A, Nakai K, Yano K, Hosokawa K, Shibata M, Mashimo T. The Animal
1458 Model of Spinal Cord Injury as an Experimental Pain Model. *Journal of*
1459 *Biomedicine and Biotechnology*. 2011; 11 pages. doi:10.1155.
1460

1461 Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE.
1462 Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host
1463 and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*. 2006;
1464 v. 108, n.6, p.2114-2120.
1465
1466 Olby, N. Current concepts in the management of acute spinal cord injury.
1467 *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1999; v.13, p.399-407.
1468
1469 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Aderson SM, Li B. Bone marrow
1470 cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410:701-5.
1471
1472 Otero, RM. Introdução às Células-tronco in: Morales MM. *Terapias Avançadas:*
1473 *Células-tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde*. Atheneu,
1474 2006.
1475
1476 Owens MA, Vall HG, Hurley AA, Wormsley SB. Validation and quality control of
1477 immunophenotyping in clinical flow cytometry. *Journal of Immunological*
1478 *Methods*. 2000; 243: 33–50.
1479
1480 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human
1481 mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
1482
1483 Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F,
1484 Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman
1485 PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. Dissimilar Differentiation of
1486 Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and
1487 Adipose Tissue. *Experimental Biology and Medicine*. 2008; 233:901-913
1488
1489 Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a
1490 new acute cord injury model in the rat. *Surgical Neurology*. 1978; v. 10, n.1,
1491 p.38-43.
1492
1493 Robey PG. Stem cells near the century mark. *The Journal of Clinical*
1494 *Investigation*. 2000; v.105, n.11, p.1489-1491.

1495 Ryu HH, Kang BJ, Park SS, Kim Y, Sung GJ, Woo HM, Kim WH, Kweon OK.
1496 Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fat, Bone Marrow,
1497 Wharton's Jelly, and Umbilical Cord Blood for Treating Spinal Cord Injuries in
1498 Dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2012.
1499
1500 Schwarz S, Schwab S, Keller E, Bertram M, Hacke W. Neurogenic impairment
1501 of cardiopulmonary function in acute cerebral lesions. *Der Nervenarzt*. 1997; v.
1502 68, p. 956-962.
1503
1504 Sedy J, Zicha J, Kunes J, Jendelová P, Syková E. Rapid but not Slow Spinal
1505 Cord Compression Elicits Neurogenic Pulmonary Edema in the Rat.
1506 *Physiological Research. Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2009; v.58, p.
1507 269-277.
1508
1509 Seim III HB. Cirurgia da Espinha Toracolombar. In: Fossum TW. *Cirurgia de*
1510 *Pequenos Animais*. 2. ed. São Paulo: Roca; 2005. p.1259- 1291.
1511
1512 Soares MBP. Células-tronco Adultas in: Morales MM. *Terapias Avançadas:*
1513 *Células-tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde*. Atheneu,
1514 2006.
1515
1516 Souza VF, Lima MCL, Reis SRA, Ramalho LMP, Santos JN. Células-tronco:
1517 uma breve revisão. *Revista Ciência Médica e Biológica*. 2003; v.2, n.2, p. 251-
1518 256.
1519
1520 Souza CF, Napoli P, Han SW, Lima VC, Carvalho ACC. Células-Tronco
1521 Mesenquimais: Células Ideais para a Regeneração Cardíaca? *Revista*
1522 *Brasileira de Cardiologia Invasiva*. 2010; v. 18 (3), p. 344-353.
1523
1524 Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies: I. Experimental
1525 techniques to produce acute and gradual compression. *AMA Archives of*
1526 *Neurology & Psychiatry*. 1953; v.70, p. 813-818.
1527

1528 Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human
1529 spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*. 1997; 86: 483-92.
1530

1531 Tebet MA, Barros Filho TEP, Machado IR, Carvalho MOP, Hanania FR, Daci K.
1532 Efeito da metilprednisolona na lesão medular em ratos: análise funcional e
1533 histológica. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2003; v. 11, n. 2, p. 80-87.
1534

1535 Vialle EN, Vialle LR, Bleggi-Torres LF, Sakamoto KS. Avaliação histológica do
1536 efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos.
1537 *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2007a; v. 42, n.4, p. 101-113.
1538

1539 Vialle EN, Carvalho KAT, Moreira GHG, Francisco JC, Simeoni RB, Oliveira L,
1540 Cunha RC, Guarita-Souza LC, Olandoski M, Vialle LR. Avaliação funcional da
1541 terapia autóloga de células derivadas medula óssea, fração mononuclear no
1542 trauma crônico da medula espinhal – modelo experimental em animais. *JBT*
1543 *Jornal Brasileiro de Transplantes*. 2007b; 10:664-668.
1544

1545 Villanova Júnior JA. Padronização e avaliação histológica de um modelo
1546 experimental de lesão medular. *Ciência Rural*. No prelo.
1547

1548 Vizzard MA. Changes in urinary bladder neurotrophic factor mRNA and NGF
1549 protein following urinary bladder dysfunction. *Experimental. Neurology*. 2000;
1550 161:273-284.
1551

1552 Vizzard MA. Neurochemical plasticity and the role of neurotrophic factors in
1553 bladder reflex pathways after spinal cord injury. In: *Progress in Brain Research*.
1554 Elsevier : Amsterdam; 2006. p. 97-115.
1555

1556 Uvelius B, Mattiasson A. Collagen content in the rat urinary bladder subjected to
1557 infravesical outflow obstruction. *Journal of Urology*. 1984; v.132, n.3, p.587-590.

1558 Wang N, Li Q, Zhang L, Lin H, Hu J, Li D, Shi S, Cui S, Zhou J, Ji J, Wan J, Cai
1559 G, Chen X. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Peritonral Injury through
1560 Secretion of TSG-6. Plos One Journal. 2012, v. 7, p. 1-17.

1561

1562 Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, et al. Clonally
1563 expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate
1564 myocardium after myocardial infarction. The Journal of Clinical Investigation.
1565 2005;115(2):326-38.

1566

1567

1568

1569

1570

1571

1572

1573

1574

1575

1576

1577

1578

1579

1580

1581

1582

1583

1584

1585

1586

1587

1588

1589

1590

1591

ANEXO A



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

PUCPR

Curitiba, 1 de setembro de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 637 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Aplicação intravenosa de células-tronco em ratos submetidos à lesão raquimedular

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Alexandra Justino da Silva

EQUIPE DE PESQUISA:

Alexandra Justino da Silva, Juliany Gomes Quitzan, José Villanova Júnior, Paulo Stud Brofmann, Carmen Lúcia Rebelato, Corine Fernandes Nascimento, Letícia Fracaro

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCAA / Mestrado em Ciência Animal

| ESPÉCIE DE ANIMAL | SEXO | IDADE / PESO | CATEGORIA | QUANTIDADE |
|------------------------------------|--------|------------------------|-----------|------------|
| Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) | Machos | 20 semanas 250-270g | D | 39 |

O colegiado do CEUA em reunião no dia 01/09/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando 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.



ANEXO B

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC/ PR

PROJETO DE PESQUISA

Título: APLICAÇÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS-TRONCO EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO RAQUIMEDULAR

Área Temática:

Pesquisador: ALEXANDRA JUSTINO DA SILVA

Versão: 1

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CAAE: 04260412.0.0000.0100

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 67981

Data da Relatoria: 01/08/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto em 1ª versão que objetiva avaliar a capacidade de regeneração das lesões medulares em ratos submetidos à terapia celular com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano e a interferência de corticoterapia no tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a capacidade de regeneração das lesões medulares em ratos submetidos à terapia celular com células-tronco de material adiposo humano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para o paciente humano doador não há riscos e ou benefícios pois o material doado trata-se de descarte.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta todas as informações, metodologia e descrições de procedimentos necessários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ANEXO C

A) Escala motora: teste de coordenação da função motora.

- 0 – nenhum movimento com a pata traseira, não suporta o peso do corpo sobre a mesma;
- 1 – escassos movimentos percebidos na pata, não consegue suportar o peso do corpo sobre a pata;
- 2 – freqüente e/ou vigoroso movimento em MMII, não suporta o peso;
- 3 – consegue suportar o peso sobre a pata traseira, podendo dar um ou dois passos;
- 4 – suporta todo o peso do corpo, consegue dar passos consistentes usando a porção distal da pata, flexão do quadril mantida;
- 5 – caminha com leve déficit;
- 6 – caminha movimentando normalmente todas as articulações da pata traseira.

B) Extensão dos dedos: reflexo de extensão dos dedos da pata traseira quando o animal é levantado pelo rabo.

- 0 – nenhuma extensão;
- 1 – mínima extensão, dedos flácidos;
- 2 – normal extensão dos dedos;
- 3 – hiperextensão com tremores dos dedos ou da pata.

C) Retirada em extensão: reflexo de retirada da pata traseira contra o corpo quando esta é manualmente estendida.

- 0 – sem flexão de retirada, pata traseira flácida;
- 1 – fraco ou lento movimento contra o corpo;
- 2 – retirada normal da pata traseira contra o corpo;
- 3 – hiperflexão da pata traseira com tremores da mesma.

D) Retirada contra dor: reflexo de retirar a pata em direção ao corpo em resposta a um estímulo aplicado na eminência hipotenar da pata.

- 0 – nenhuma resposta da pata apertada;
- 1 – movimento abrupto da pata, mas sem retirar a pata traseira contra o corpo;
- 2 – normal, rápida retirada da pata traseira contra o corpo;
- 3 – hiperflexão da pata traseira, com tremores da mesma.

E) Resposta à ventralização: é o reflexo no qual o animal se endireita, voltando à sua posição habitual, quando colocado de costas numa superfície lisa.

- 0 – animal continua na posição supina;
- 1 – lento retorno à posição prona, mais de 0,5 segundo;
- 2 – retorno médio à posição prona;
- 3 – retorno rápido à posição prona, em 0,5 segundo.

F) Ato de agarrar a barra com a pata traseira: reflexo de percepção, em resposta ao contato da pata traseira com uma barra de pequeno diâmetro.

- 0 – não responde ao toque da barra contra a pata;
- 1 – a pata traseira responde ao toque, mas não consegue agarrá-la;
- 2 – a pata traseira agarra com sucesso a barra, mas de modo fraco;
- 3 – a pata traseira agarra fortemente a barra e puxa-a contra seu corpo.

Fonte: Kuhn P.L. e Wrathall J.R.(21)

ANEXO D

Avaliação Funcional Escala Basso, Beatie and Bresnahan (B.B.B.)

A escala BBB observa os movimentos da articulação do quadril, joelho, tornozelo, posição do tronco, rabo e patas traseiras. A partir destas observações, foram atribuídos pontos de zero a 21, sendo zero o correspondente à ausência total de movimentos e 21 à presença de movimentos normais .

- 0 - não observação de movimento nos membros posteriores(MP)
- 1 - suave movimento de uma ou duas articulações, normalmente o quadril e/ou joelho.
- 2 - extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e suave movimento de uma outra articulação
- 3 - extenso movimento de duas articulações do MP
- 4 - suave movimento de mais de três articulações MP
- 5 - suave movimento de duas articulações e extenso movimento de uma terceira
- 6 - extenso movimento de duas articulações e suave movimento de uma terceira extenso movimento em todas as três articulações do MP
- 7 - largo movimento com nenhum peso de suporte ou colocação plantar da pata com nenhum peso de suporte
- 8 - colocação plantar da pata com peso suporte em postura (quando parado) ou ocasional, freqüente, ou consistente suporte de peso na passada dorsal e nenhum apoio na passada plantar , movimentos suaves sem suportar o peso do corpo .
- 9 - ocasional suporte de peso na passada plantar, nenhum MS-MP coordenação
- 10 - freqüência constante do suporte de peso na passada plantar, nenhuma MS-MP coordenação
- 11 - freqüência constante do suporte de peso na passada plantar e ocasional MS de coordenação
- 12 - freqüência constante do suporte de peso na passada plantar e freqüente MS-MP de coordenação
- 13 - constante suporte de peso na passada plantar ,constante MS-MP de coordenação;

14 - constante passada plantar e constante MS-MP com coordenação e predominância da posição das patas em rotação (interna ou externa) quando começa o contato inicial com a superfície antes mesmo de levantar no fim da postura ou freqüente passada plantar, constante MS-MP com coordenação e ocasional passada dorsal

15 - constante passada plantar constante MS-MP coordenados ; e nenhum movimento do dedos dos pés ou ocasional movimento dos dedos dos pés durante o avanço do membro seguinte

Predominante posição da pata, paralela ao corpo no contato inicial

16 - constante passada plantar e constante coordenação MS-MP durante o andar ;e dedos dos pés livres ocorrem freqüentemente durante o avançar dos membros dianteiros

predominantemente a posição das patas estão paralelas no contato inicial e rodados ao se levantar .

17 - constante passada plantar e constante coordenação MS-MP durante o andar; e os dedos dos pés livres ocorrem freqüentemente durante o avançar dos membros dianteiros predominantemente a posição das patas estão paralelas no contato inicial e ao levantar-se.

18 - constante passada plantar e constante coordenação MS-MP durante o andar, os dedos dos pés livres ocorrem constantemente durante o avançar dos membros dianteiros predominantemente a posição das patas estão paralelas no contato inicial e rodadas ao levantar-se.

19 - constante passada plantar e constante coordenação MS-MP durante o andar, os dedos dos pés livres ocorrem constantemente durante o avançar dos membros dianteiros predominantemente a posição das patas estão paralelas no contato inicial e ao levantar-se; o rabo mantém-se para baixo todo o tempo ou apenas parte dele.

20 - constante passada plantar e constante coordenação ao andar, constantes movimentos livres dos dedos dos pés ;predominantemente a posição das patas estão paralelas no contato inicial e ao levantar se ;e instabilidade do tronco ;rabo constantemente para cima.

21 - constante passada plantar e andar coordenado, constantes movimentos livres dos pés, posição das patas predominantemente paralelas durante a postura, constante estabilidade de tronco, rabo constantemente para cima.