

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

THAIS GABRIELLE FERREIRA DE SOUSA LOPES DA SILVA

**AVALIAÇÃO SENSITIVA, MOTORA E CISTOMÉTRICA DE CÃES
COM LESÃO MEDULAR SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

*(Evaluation sensitive, motor and cystometric of dogs with medullary lesion
submitted to mesenchymal stem cell transplantation)*

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

THAIS GABRIELLE FERREIRA DE SOUSA LOPES DA SILVA

**AVALIAÇÃO SENSITIVA, MOTORA E CISTOMÉTRICA DE CÃES
COM LESÃO MEDULAR SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

***(Evaluation sensitive, motor and cystometric of dogs with medullary lesion
submitted to mesenchymal stem cell transplantation)***

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: Prof. Dr. José Ademar Villanova Junior

Coorientador: Profa. Dra. Cláudia Turra Pimpão

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	viii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	x
RESUMO GERAL.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 REFERÊNCIAS.....	5
CAPÍTULO 1	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 INTRODUÇÃO.....	12
2.2 ANATOMO-FISIOLOGIA DOS MECANISMOS DE MICÇÃO.....	13
2.2.1 Mecanismos neurais e controle da micção.....	13
2.2.2 Vias neurais envolvidas no preenchimento da bexiga.....	16
2.2.3 Via aferente da sensação de plenitude vesical.....	16
2.2.4 Mecanismo de esvaziamento da bexiga urinária.....	17
2.3 FISIOPATOLOGIA DA MICÇÃO.....	20
2.3.1 Distúrbios miccionais decorrentes de lesões intracranianas.....	20
2.3.2 Sinais clínicos relacionados a lesões das vias neurais envolvidas no controle da micção.....	20
2.3.2.1 Lesões de centros superiores (neurônios motores superiores – NMS).....	20
2.3.2.2 Lesões periféricas (neurônios motores inferiores - NMI).....	21
2.4 CISTOMETRIA EM CÃES.....	22

2.4.1 Parâmetros.....	23
2.4.2 Detrusor normal.....	23
2.4.3 Detrusor Hiperativo.....	24
2.4.4 Capacidade vesical.....	24
2.4.5 Complacência vesical (C).....	24
2.4.6 Sensibilidade vesical.....	25
2.5 CONCLUSÃO.....	25
2.6 REFERÊNCIAS.....	26

CAPÍTULO 2

3 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA SENSIBILIDADE, MOTRICIDADE E MICÇÃO APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALÓGENAS EM CÃES COM LESÃO MEDULAR.....	28
Resumo.....	28
Abstract.....	29
3.1 INTRODUÇÃO.....	30
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.2.1 Animais.....	33
3.2.2 Avaliações sensitivas.....	33
3.2.3 Avaliações laboratoriais.....	34
3.2.4 Avaliações cistométricas.....	35
3.2.5 Cultivo de CTDA de cães.....	35
3.2.6 Citometria de Fluxo.....	36
3.2.7 Diferenciação celular.....	37
3.2.7.1Diferenciação adipogênica e osteogênica.....	37
3.2.7.2 Diferenciação condrogênica.....	38
3.2.8 Viabilidade das CTDA.....	38
3.2.9 Protocolo anestésico.....	38
3.2.10 Transplantes de CTDA no espaço epidural.....	38
3.3 RESULTADOS.....	39

3.3.1 Dados epidemiológicos.....	39
3.3.2 Avaliações laboratoriais.....	40
3.3.3 Análise imunofenotípica por citometria de fluxo.....	41
3.3.4 Avaliações cistométricas.....	43
3.4 DISCUSSÃO.....	45
4 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

***À minha avó June Araújo que é um exemplo de mulher, à minha
irmã Bruna que me presenteou com o mais belo incentivo que é a
minha pequena sobrinha Alice, à minha mãe Farida e ao meu irmão
Bruno. Vocês são tudo para mim.***

“Por vezes sentimos que aquilo
que fazemos não é senão uma
gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe faltasse
uma gota”
(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força para seguir o meu sonho, e me iluminou para seguir adiante. A minha família que sempre me apoiou, me ajudou e acreditou que eu poderia ir longe e que sempre teve muita paciência comigo, e me fazem feliz sempre.

Agradeço principalmente a minha irmã Bruna Paola Botnar, por ter me dado força, incentivo, conselhos e me aturar como só ela sabe fazer. Pá, eu te amo e agradeço a Deus todos os dias por ter você perto de mim.

Agradeço a minha avó June Araújo pela enorme garra, e por minha criação, e por ser um exemplo de mulher. Vozinha sem você eu não teria conseguido muito obrigada pelo incentivo e por toda dedicação em tempo integral como uma mãe que a só a senhora foi.

Agradeço principalmente o professor Dr. José Ademar Villanova Junior, por ter aceitado me orientar, e o fez com muita paciência, ética, comprometimento, sabedoria e amizade. Professora muito obrigada, o senhor com certeza é um líder que eu pretendo me espelhar para seguir adiante. Não só na parte profissional, mas na vida, o senhor é um exemplo de ser humano digno e um exemplo.

À minha coorientadora Professora Doutora Claudia Turra Pimpão, pela paciência e por ter me guiado no início do mestrado. Um exemplo de mulher competente e compromissada.

Ao Professor Saulo Weber, pela enorme ajuda de maneira comprometida e dedicada.

Ao Dr. Paulo Roberto Slud Brofman, e seus competentes e dedicados pesquisadores Letícia, Fabiana, Lidianne e Felipe e a doutora Carmem Rebelatto do Núcleo de Terapia Celular da PUCPR. Sem eles a realização desta dissertação não seria possível.

À equipe da Unidade Hospitalar para Animais de Companhia da PUCPR, ao professor Luiz Guilherme Achcar Capriglione, por mais uma vez estar presente na minha vida científica, aos residentes e estudantes Hannelore, Fagner, Mariana, Manoela, Priscila e Daniel, os funcionários Carmem, Elias, Jéssica, Jennifer e Dani. Todos os profissionais do hospital me ajudaram de maneira excepcional.

À todos os proprietários dos cães que de maneira comprometida se esforçaram ao máximo para que o projeto desse certo, e estavam confiantes com o meu trabalho. E à todos os cães que participaram do projeto. Meu respeito e admiração serão eternas.

A todos que fizeram parte da minha história, meu eterno agradecimento, sem vocês eu não teria conseguido, muito obrigada.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

Inicialmente é apresentada uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 1 revisa a literatura consultada.

O capítulo 2 enfoca a avaliação funcional da sensibilidade, motricidade e micção após o transplante de células-tronco mesenquimais.

A conclusão geral desta dissertação dispõe de sugestões para estudos futuros.

RESUMO GERAL

A lesão medular (LM) é a lesão traumática aguda de elementos neurais do canal medular (medula e cauda equina), resultando em deficiência motora e/ou sensorial, temporária ou permanente de músculos e órgãos. A cistometria pode ser útil para o diagnóstico de afecções sediadas em todo o neuroeixo, desde o córtex cerebral até as raízes da cauda equina, complementando, assim, o exame neurológico. Em certas circunstâncias, na vigência de um exame neurológico normal, o exame cistométrico poderá fornecer elementos para o diagnóstico, por ser usado como um exame neurológico da bexiga. O estudo da terapia celular no trauma medular reveste-se de grande importância por se tratar de lesão ainda considerada como intratável e incurável. Devido ao ceticismo e controvérsias sobre o uso de células-tronco no trauma medular em diferentes espécies, inclusive no homem, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos das células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA) em cães com lesão medular toracolombar crônica.

Palavras-chave: Paraplegia. Incontinência urinária. Células-tronco derivadas do tecido adiposo. Terapia celular. Cão.

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) is the acute traumatic injury of neural elements of the spinal canal (spinal cord and cauda equina), resulting in physical disabilities and/or sensory impairment, temporary or permanent muscle and organs. The cystometry may be useful for the diagnosis of conditions based on the entire neuraxis from the cerebral cortex to the roots of the cauda equina, thereby complementing the neurological examination. In certain circumstances, in the presence of a normal neurological examination, the cystometric examination may provide elements for diagnosis, being used as a neurological exam of the bladder. The study of cell therapy in spinal cord trauma is of great importance because it is injury still considered untreatable and incurable. Due to skepticism and controversy on the use of stem cells in spinal cord trauma in different species, including humans, this study aimed to evaluate the effects of stem cells derived from adipose tissue (CTDA) in dogs with chronic spinal cord injury thoracolumbar.

Keywords: Paraplegia. Urinary incontinence. Stem cells derived from adipose tissue. Cell therapy. Dog.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
APC	Aloficocianina
C	Complacência vesical
CTDAh	Células-tronco derivadas do tecido adiposo humano
CTM	Células-tronco mesenquimais
FA	Fosfatase alcalina
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
H₂O	Água
LM	Lesão medular
NMI	Neurônio motor inferior
NMS	Neurônio motor superior
P_{abd}	Pressão abdominal
P_{det}	Pressão do detrusor
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína peridina clorofila
pH	Potencial hidrogeniônico
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
P_{ves}	Pressão vesical
SN	Sistema nervoso
SNA	Sistema nervoso autônomo
TA	Tecido adiposo
UHAC	Unidade Hospitalar para Animais de Companhia

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores de referência de Griffiths, 1982.....	33
Tabela 2. Dados epidemiológicos dos animais participantes do estudo.....	39
Tabela 3. Resultados referentes aos escores obtidos pelos animais na escala de Griffins, 1982 nos diversos momentos avaliados.....	40
Tabela 4. Resultados referentes às diferentes pressões obtidas durante o exame cistométrico nos diversos momentos avaliados neste estudo.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema das vias neurais da micção.....	14
Figura 2. Esquema da inervação da bexiga urinária e uretra.....	15
Figura 3. Cão submetido à avaliação cistométrica.....	23
Figura 4. Cão submetido à compressão cutânea interdigital.....	34
Figura 5. Cão submetido à compressão da falange proximal do quarto dedo.....	34
Figura 6. Cateter uretral duplo lúmen 7 fr (Dynamed®).....	35
Figura 7. Análise imunofenotípica por citometria de fluxo.....	41
Figura 8. Diferenciação <i>in vitro</i> das CTDAs após 21 dias de cultivo.....	42
Figura 9. Avaliação cistométrica em cão antes do transplante de células- tronco mesenquimais.....	43
Figura 10. Avaliação cistométrica em cão 30 dias após o transplante de células-tronco mesenquimais.....	44
Figura 11. Avaliação cistométrica em cão 60 dias após o transplante de células-tronco mesenquimais.....	44

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular (LM) é a lesão traumática aguda de elementos neurais do canal medular (medula e cauda equina), resultando em deficiência motora e/ou sensorial, temporária ou permanente (*National Spinal Cord Injury Database* 2013). A LM é uma das mais devastadoras entre as lesões que afetam o ser humano (CARVALHO et al., 2007).

A lesão de origem traumática é incapacitante e representa grande impacto na sociedade e grave problema de saúde pública (CAMPOS et al., 2008).

A LM acomete mundialmente cerca de 2,5 milhões de pessoas (SCHWAB et al., 2006), e a violência está nitidamente ligada a estes dados estatísticos, porém a etiologia do trauma medular varia em função da atividade desenvolvida (FAULKNER et al., 2010). A maioria das vítimas é jovem, saudável e sofrerá incapacidade por longo tempo, pois não existe tratamento efetivo (SAKANAKA et al., 2006; FITZMAURICE, 2011).

A LM ocorre em cerca de 15 a 20% das fraturas da coluna vertebral (RABEH e CALIRI, 2010). Na Europa, a incidência anual de novos casos é de 10 a 30 novos casos por milhão de habitantes. Nos Estados Unidos, varia de 27 a 83 por milhão, dos quais mais de 80% são homens (McDONALD et al., 2003; WYNDAELE e WYNDAELE, 2006). No Brasil, a estimativa é de 40 novos casos por milhão de habitantes por ano (RABEH e CALIRI, 2010). Estima-se que mais de 130.000 indivíduos sofram lesão medular a cada ano no mundo (SOBANI et al., 2010).

A maior incidência de LM está entre os adultos jovens (BERG et al., 2011), e a média de idade dos indivíduos é de 37,6 anos, sendo a causa mais frequente o acidente automobilístico (50,4%). As quedas (23,8%), a violência (11,2%) e acidentes durante a prática de esportes (9%) também estão entre as causas mais comuns (HO et al., 2007).

A localização anatômica está diretamente relacionada ao mecanismo de trauma, sendo a região cervical o segmento mais atingido (DEFINO, 1999; VIALLE et al., 2007; VASCONCELOS e RIBERTO, 2011). Segundo Vialle et al. (2007) e Vasconcelos e Riberto (2011) não há variação sazonal na incidência do trauma

em coluna vertebral e na maior parte das vezes não há lesão nervosa. Para eles quando a LM ocorre, a principal manifestação é a paraplegia.

Segundo Custódio et al. (2009) a expectativa de vida é semelhante a de um indivíduo normal, com taxas de morbidades relacionadas à deficiência cada vez mais baixas. Porém, como ainda não há tratamento efetivo para restaurar funções perdidas pela medula comprometida, a reabilitação e readaptação com auxílio de uma equipe interdisciplinar se tornaram fases obrigatórias do tratamento da LM (VASCONCELOS e RIBERTO, 2011).

Cronicamente, as maiores causas de morbidade e de mortalidade após LM são complicações decorrentes da perda direta dos controles esfinterianos (vesical e anal), perda de sensibilidade com formação de escaras e processos osteoarticulares como escoliose, artropatias e osteoporose (VIALLE et al., 2001; MEYER et al., 2003). Durante as três primeiras semanas após o trauma, a maioria dos pacientes sofre alterações tromboembólicas, não necessariamente sintomáticas, sendo esta a maior causa no atraso da reabilitação. Outro fator importante é a alteração no relacionamento psicossocial, pois depressão, uso de drogas e suicídio que apresentam índices elevados em relação a população em geral. Nos pacientes tetraplégicos, somam-se ainda as alterações da função pulmonar e perda da termorregulação (POYNTON et al., 1997; VIALLE et al., 2002).

Embora não exista cura farmacológica para danos à medula espinhal, o tratamento clínico e/ou cirúrgico pode influenciar a sobrevivência neuronal pela interrupção dos eventos subsequentes ao trauma. O tempo para se iniciar o tratamento é fundamental na determinação do prognóstico e a presença de percepção da dor não garante a recuperação neurológica completa (FITZMAURICE, 2011).

A progressão dos danos teciduais à medula espinhal está quase concluída em 48 horas, preconizando-se que o tratamento, para ser efetivo, deve ser instituído dentro desse prazo. Os resultados terapêuticos serão variáveis e a abordagem primária visa a contenção de danos (SHARP e WHEELER, 2005; TOOMBS e WATERS, 2007).

Várias pesquisas que apresentaram resultados aplicáveis ao ser humano foram realizadas em animais em etapa pré-clínica. Pesquisadores admitem que a única forma de comparar resultados é a partir de lesões padronizadas e em grande número de espécimes (NOBLE e WRATHALL, 1985; FALCONER et al., 1996; CARVALHO et al., 2007).

A partir do início do século XXI, com o advento de novos conhecimentos sobre a plasticidade das células-tronco e com o surgimento de estudos científicos que sugeriram a transdiferenciação direta e diferenciação dessas células, estas passaram a ter seu emprego considerado na terapia celular (MEIRELLES et al., 2006). Atualmente a possibilidade de terapia com células-tronco conquistou notoriedade e tornou-se mais uma alternativa (LAI et al., 2008).

As células-tronco possuem capacidade de autorrenovação e podem se diferenciar em múltiplas linhagens celulares (KORBLING e ESTROV, 2003; PITTENGER e MARTIN, 2004). As células-tronco mesenquimais (CTM) representam uma população de células-tronco somáticas que podem ser isoladas, expandidas em cultura e caracterizadas *in vitro* e *in vivo*, e tem como funções a manutenção e renovação de tecidos adultos (PITTENGER e MARTIN, 2004; CAPLAN e DENNIS, 2006; REBELATTO et al., 2008).

Além do potencial de diferenciação, as CTM secretam fatores bioativos que protegem e reparam o tecido danificado (CAPLAN, 2009), e possuem baixa imunogenicidade, podendo ser utilizadas de forma alogênica sem provocar rejeição (MINGUELL et al., 2000; PITTENGER e MARTIN, 2004). Também podem ter efeito imunossupressor no local da lesão, pois reprimem a vigilância imunológica e inibem a destruição mediada pelas células T e B no sítio danificado (KOLOSSOV et al., 2005).

As CTM podem ser obtidas de diferentes fontes, como medula óssea, polpa dentária, cordão umbilical, bulbo olfatório e o tecido adiposo. As vantagens de se trabalhar com células-tronco provenientes de tecido adiposo são a fácil obtenção e a quantidade elevada de células (DE UGARTE et al., 2003; MUSINA et al., 2005; NÖTH et al., 2002; SABATINI et al., 2005; SHI et al., 2005; CRIGLER et al., 2007).

Baseando-se na função das CTM de renovação de tecidos adultos, por meio da diferenciação celular ou a liberação de fatores bioativos que atuariam de forma parácrina, espera-se que as células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA), quando transplantadas em animais com lesão medular, sejam capazes de regenerar o tecido, inclusive com recuperação funcional (PAULA et al., 2005; PEREIRA, 2008).

O uso de células-tronco em ratos com lesão medular revelou migração de células para o local lesionado (PAL et al., 2010) e redução da reação inflamatória (PARK et al., 2010). Silva et al. (2014) observaram em seus estudos que o transplante de células-tronco influenciou de forma benéfica a micção de ratos com lesão medular.

O estudo da terapia celular no trauma medular reveste-se de grande importância por se tratar de lesão ainda considerada como intratável e incurável. Devido ao ceticismo e controvérsias sobre o uso de células-tronco no trauma medular em diferentes espécies, inclusive no homem, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos das CTDA em cães com lesão medular toracolombar crônica. Os objetivos específicos foram: avaliar a sensibilidade cutânea e esquelética, deambulação e a cistometria em cães com lesão toracolombar crônica, apresentando mais de três meses de lesão.

A presente dissertação foi dividida em dois capítulos com os seguintes títulos: (1) Vias neurais da micção, distúrbios e avaliação cistométrica em cães - revisão de literatura; (2) Avaliação funcional da sensibilidade, motricidade e micção após transplante de células-tronco mesenquimais alógenas em cães com lesão medular.

1.1 REFERÊNCIAS

BERG, M. V. D.; CASTELLOTE, J. M.; MAHILLO-FERNANDEZ, I.; DE PEDRO-CUESTA, J. Incidence of traumatic spinal cord injury in Aragón, Spain (1972-2008). **Journal of Neurotrauma**. v. 28, n. 3, p. 469-77. 2011.

CAMPOS, M. F; RIBEIRO, A. T; LISTIK, S.; PEREIRA, C. A. B; SOBRINHO, J. A; RAPOPORT, A. Epidemiologia do traumatismo de coluna vertebral. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 35, n. 2, p. 88-93. 2008.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of Pathology**. v. 217, n. 2, p. 318-324. 2009.

CAPLAN A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 98, p. 1076-1084. 2006.

CARVALHO, K. A. T.; VIALLE, E. N.; MOREIRA, G. H. G.; FRANCISCO, J. C.; SIMEONI, R. B.; OLIVEIRA, L.; CUNHA, R. C.; GUARITA-SOUZA, L. C.; OLANDOSKI, M.; VIALLE, L. R. G. Avaliação funcional da terapia autóloga de células derivadas medula óssea, fração mononuclear no trauma crônico da medula espinal – modelo experimental em animais. **Jornal Brasileiro de Transplantes**. v. 10, p. 664-668. 2007.

CRIGLER, L.; KAZHANIE, A.; YOON, T.J.; ZAKHARI, J.; ANDERS, J.; TAYLOR, B.; VIRADOR, V. M. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. **The FASEB Journal – The Journal of the American Societies for Experimental Biology**. v. 21, n. 9, p. 2050-2063. 2007.

CUSTÓDIO, N. R. de O.; CARNEIRO, M. R.; FERES, C. C.; LIMA, G. H. S.; JUBÉ, M. R. R.; WATANABE, L. E.; SALIBA, L. G. R. S. O.; DAHLER, S.; GARCIA, A. C.

F. Lesão Medular no Centro de Reabilitação e Readaptação Dr. Henrique Santillo (CRER-GO). **Coluna/Columna**. v. 8, n. 3, p. 265-268. 2009.

DE UGARTE, D. A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO Z.; ZUK, P. A.; ZHU, M.; DRAGOO, J. L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M. H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**. v. 174, n. 3, p. 101-109. 2003.

DEFINO, H. L. A. Trauma raquimedular. **Medicina**. v. 32, n. 4, p. 388-400. 1999.

FALCONER, J. C.; NARAYANA, P. A.; BHATTACHARJEE, M.; LIU, S. J. Characterization of an experimental spinal cord injury model using waveform and morphometric analysis. **Spine**. v. 21, n. 1, p. 104-112. 1996.

FAULKNER, G.; GORCZYNSKI, P.; ARBOUR, K.; LETTS, L.; WOLFE, D. L.; MARTIN, G. K. A. Messenger and Methods of Disseminating Health Information Among Individuals with Spinal Cord Injury: A Scoping Review. In: BERKOVSKY, T. C. **Handbook Spinal Cord Injuries: Types, Treatments and Prognosis**. New York: Nova Science Publishers, 2010. Cap. 8, p. 349-374.

FITZMAURICE, S. N. **Neurologia em Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 181-183.

HO, C. H.; WUERMSER, L. A.; PRIEBE, M. M.; CHIODO, A. E.; SCELZA, W. M.; KIRSHBLUM, S. C. Spinal cord injury medicine. Epidemiology and classification. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. v. 88, n. 3, Suppl 1, p. S49-54. 2007.

KOLOSSOV, E.; LU, Z.; DROBINSKAYA, I.; GASSANOV, N.; DUAN, Y.; SAUER, H.; MANZKE, O.; BLOCH, W.; BOHLEN, H.; HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B.

K. Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. **The FASEB Journal – The Journal of the American Societies for Experimental Biology**. v. 19, n. 6, p. 577-579. 2005.

KORBLING M.; ESTROV Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **The New England Journal of Medicine**. v. 349, n. 6, p. 570-582. 2003.

LAI, Y.; DROBINSKAYA, I.; KOLOSSOV, E.; CHEN, C.; LINN, T. Genetic modification of cells for transplantation. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 60, n. 2, p. 146-159. 2008.

McDONALD, J. W.; BECKER, D.; SADOWSKY, C. L. Restoring function after spinal cord injury. **The Neurologist**. v. 9, p. 1-15. 2003.

MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. v.119, p. 2204-2213. 2006.

MEYER, F.; VIALLE, L. R.; VIALLE, E. N.; BLEGGI-TORRES, L. F.; RASERA, E.; LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, n. 3, p. 203-208. 2003.

MINGUELL, J. J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and Clinical Utilization of Mesenchymal Progenitor Cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, n. 8, p. 881-887. 2000.

MUSINA, R. A.; BEKCHANOVA, E. S.; SUKHIKH, G. T. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v. 139, n. 4, p. 504-509. 2005.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY DATABASE. Disponível em: <http://www.spinalcord.uab.edu>. Acessado em 09 de março de 2013.

NOBLE, L. J.; WRATHALL, J. R. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. **Experimental Neurology**. v. 88, n. 1, p. 135-149. 1985.

NÖTH, U.; OSY CZKA, A. M.; TULI, R.; HICKOK, N. J.; DANIELSON, K. G.; TUAN, R. S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 20, n. 5, p. 1060-1069. 2002.

PAL, R.; GOPINATH, C.; RAO, N.; BANERJEE, P.; KRISHNAMOORTHY, V.; VENKATARAMANA, N. K.; TOTEY, S. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. **Cytotherapy**. v. 12, n. 6, p. 792-806. 2010

PARK, W. B.; KIM, S. Y.; LEE, S. H.; KIM, H.; PARK, J.; HYUN, J. K. The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats. **BioMed Central Neuroscience**. v. 11, p. 119-130. 2010.

PAULA, S.; PEDROSO, M. F.; DALBEM, A.; COSTA, Z. S. M.; VITOLA, A.; BAES, C. V. W.; SILVA, J. L. B.; FRIEDRICH, M. A. G.; COSTA, J. C. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 263-269. 2005.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 13, p. 7-14. 2008.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**. v. 95, n. 1, p. 9-20. 2004.

POYNTON, A. R.; O'FARRELL D. A.; SHANNON, F.; MURRAY, P.; McMANUS, F.; WALSH, M. G. An evaluation of the factors affecting neurological recovery following spinal cord injury. **Injury**. v. 28, n. 8, p. 545-58. 1997.

RABEH, S. A.N.; CALIRI, M. H. L. Capacidade funcional em indivíduos com lesão de medula espinhal. **Acta Paulista de Enfermagem**. v. 23, n. 3, p. 321-7. 2010.

REBELATTO, C.K.; AGUIAR, A. M.; MORETÃO, M. P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V. F.; BROFMAN, P. S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L. S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**. v. 233, n. 7, p. 901-913. 2008.

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; VILLEROCHÉ, V. J.; ROSSI, G. A.; BROUTY-BOYÉ, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**. v. 85, n. 8, p. 962-971. 2005.

SAKANAKA, M.; ZHU, P.; ZHANG, B.; WEN, T.; CAO, F.; MA, Y.; SAMUKAWA, K.; MITSUDA, N.; TANAKA, J.; KURAMOTO, M.; UNO, H.; HATA, R. Intravenous Infusion of Dihydroginsenoside Rb1 Prevents compressive Spinal Cord Injury and Ischemic Brain Damage through Upregulation of VEGF and Bcl-x. **Journal of Neurotrauma**. v. 24, n. 6, p. 1037-1054. 2006.

SCHWAB, J. M.; BRECHTEL, K.; MUELLER, C. A.; FAILLI, V.; KAPS, H. P.; TULI, S. K.; SCHLUESENER, H. J. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration - an integrative perspective. **Progress in Neurobiology**. v. 78, n. 2, p. 91-116. 2006.

SHARP, N. J. H; WHEELER, S. J. **Small animal spinal disorders: Diagnosis and Surgery**. 2ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005, p. 81-91.

SHI, S.; BARTOLD, P. M.; MIURA, M.; SEO, B. M.; ROBEY, P. G.; GRONTHOS, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthodontics & Craniofacial Research**. v. 8, n. 3, p. 191-199. 2005.

SILVA, A. J.; VILLANOVA JR. J. A.; QUITZAN, J. G.; FRACARO, L.; REBELATTO, C. L. K.; BARCHIKI, F.; DOMINGUEZ, A. C.; BROFMAN, P. R. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; MOURA, S. A. B. Effect of mesenchymal stem cells on movement and urination of rats with spinal cord injury. **Semina**. Ciências Agrárias (Online), v. 35, n.6. p. 3205-3214, 2014.

SOBANI, Z. A.; QUADRI, S. A.; ENAM, A. Stem cells for spinal cord regeneration: current status. **Surgical Neurology International**. v. 1, p. 93-107. 2010.

TOOMBS, J. P.; WATERS, D. J. Afecção do Disco Intervertebral. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007. v.1, cap.80, p.1193 - 1209.

VASCONCELOS, E. C. L. M.; RIBERTO, M. Caracterização clínica e das situações de fratura da coluna vertebral no Município de Ribeirão Preto, propostas para um programa de prevenção do trauma raquimedular. **Coluna/Columna**. v. 10, n. 1, p. 40-43. 2011.

VIALLE, E. N.; VIALLE L. R. G.; RAZERA, E.; CECHINEL, C.; SEYBOTH, C.; LEONEL, I. Controle da cistite hemorrágica em ratos submetidos à lesão medular experimental padronizada. **Arquivos de Medicina**. v. 2, p. 165-18. 2001.

VIALLE, E.; VIALLE, L. R. G.; RAZERA, E.; CECHINEL, C.; LEONEL, I.; SEYBOTH, C. **Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos à lesão**

medular experimental. Revista Brasileira de Ortopedia. v. 37, n. 3, p. 83-88. 2002.

VIALLE, E. N.; VIALLE, L. R. G.; BLEGGI-TORRES, L. F., SAKAMOTO, K. S. Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia.** v. 42, n. 4, p. 101-113. 2007.

WYNDAELE, M.; WYNDAELE, J. J. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? **Spinal cord.** v. 44, n. 9, p. 523-529. 2006.

CAPÍTULO 1

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO

Embora constitua elemento de real importância para o diagnóstico topográfico de afecções do sistema nervoso, o estudo do funcionamento da bexiga por meio da cistometria não é ainda considerado com a devida atenção por grande número de clínicos, neurologistas e urologistas. Poucos são os hospitais veterinários vinculados ou não ao ensino que tem esta ferramenta diagnóstica e prognóstica apesar de ser de fácil execução e de ter grande valor prático. Os mecanismos neurais de controle da micção são muito complexos e é sabido entre os clínicos que nem todos os casos, de início semelhantes entre si, evoluem da mesma maneira (OLBY et al., 2003; FAWCETT et al., 2007; LORENZ e KORNEGAY, 2011; PRADA, 2014).

A cistometria — que é em última análise, o exame neurológico da bexiga — pode ser útil para o diagnóstico de afecções sediadas em todo o neuroeixo, desde o córtex cerebral até as raízes da cauda equina, complementando assim, o exame neurológico; em certas circunstâncias, na vigência de um exame neurológico normal, o exame cistométrico poderá fornecer, por si só, elementos para o diagnóstico (FERNÁNDEZ e BERNARDINI, 2010; LORENZ e KORNEGAY, 2011).

A função anormal pode refletir uma mudança patológica no sistema nervoso, entretanto, a importância do controle nervoso da víscera frequentemente é negligenciada (CHRISMAN et al., 2005; FERNÁNDEZ e BERNARDINI, 2010). O exame cistométrico exige conhecimentos, às vezes bastante amplos, da anatomia e fisiopatologia do sistema nervoso central e periférico. Entretanto, em muitos casos, o exame deverá ser associado a exame urológico, o qual, mediante a cistoscopia e a cistografia, fornecerá dados sobre o estado da musculatura vesical e sobre a estruturação do órgão (D'ANCONA, 2015).

Esta revisão de literatura visa justificar a necessidade de incluir a cistometria no exame neurológico, não apenas como simples complemento, mas como elemento semiótico de real valor e, mesmo, indispensável em determinados casos (D'ANCONA, 2015).

2.2 ANATOMO-FISIOLOGIA DOS MECANISMOS DE MICÇÃO

2.2.1 Mecanismos neurais e controle da micção

A micção é o mecanismo que permite a eliminação coordenada da urina, em resposta a uma distensão gradual da bexiga urinária. Todo o sistema nervoso (SN) está envolvido neste mecanismo, tanto do ponto de vista puramente anatômico: central e periférico, como funcional por meio dos sistemas parassimpático, simpático e somático (FERNÁNDEZ e BERNARDINI, 2010; FITZMAURICE, 2011).

A forma da bexiga é variável, o órgão vazio poderá ter a forma esférica no caso de estar contraído ou apresentar-se achatado quando estiver relaxado. A bexiga cheia tem a forma ovoide. Distingue-se na bexiga uma porção maior e cranial, o corpo, e uma porção menor e caudal, o colo. A região situada entre o orifício uretral e os dois orifícios ureterais constitui o trígono vesical. A bexiga é constituída principalmente de três camadas de músculo liso, coletivamente denominadas músculo detrusor. Há também as camadas mucosa, submucosa e serosa. O músculo detrusor contém receptores adrenérgicos e colinérgicos (muscarínicos), importantes no enchimento e contração da bexiga, respectivamente (DEWEY, 2006).

Os principais receptores para a inervação autônoma eferente do corpo da bexiga são:

- Receptores beta-adrenérgicos – receptores simpáticos inervados pelo nervo hipogástrico que, em cães, se origina no segmento L1-L4 da medula espinhal, em gatos, no segmento L2-L5. O estímulo desses receptores induz ao relaxamento do músculo detrusor, permitindo o enchimento da bexiga.

- Receptores colinérgicos muscarínicos – receptores parassimpáticos inervados pelo nervo pélvico, que se origina no segmento sacral S1-S3 da medula espinhal. O estímulo desses receptores induz à contração do músculo detrusor e consequente esvaziamento da bexiga. Na parede da bexiga há também receptores sensitivos (estiramento e dor). Os receptores de estiramento são inervados pelos axônios aferentes que passam pelo nervo pélvico, em direção aos segmentos sacrais da medula espinhal (Figura 1). Os receptores da dor são inervados pelos axônios aferentes que passam pelo nervo pélvico e, principalmente, pelo nervo hipogástrico (SHARP e WHEELER, 2005; PRADA, 2014).

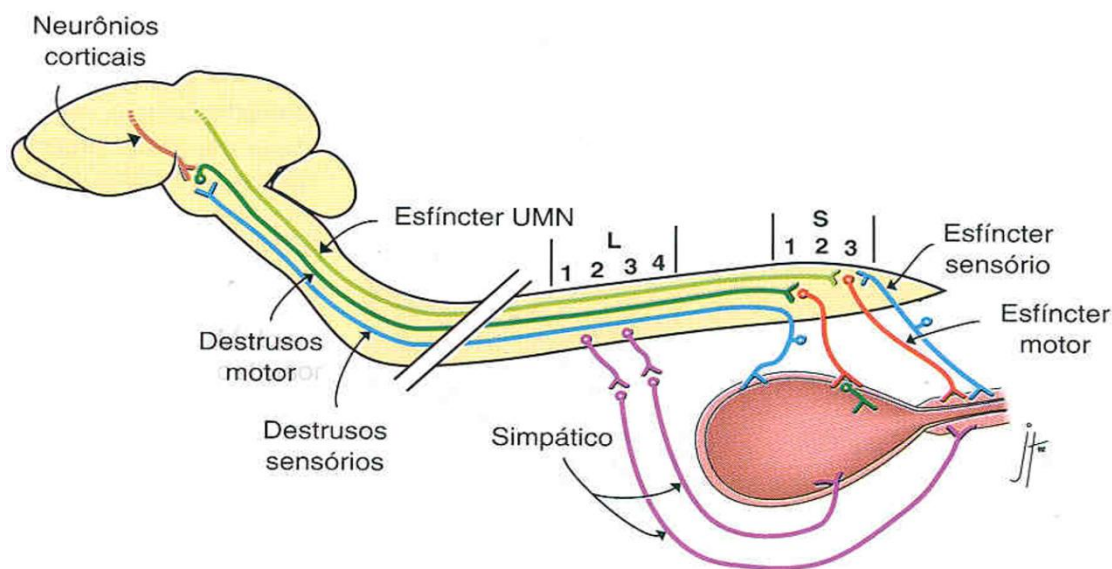


Figura 1- Esquema das vias neurais da micção. (SHARP e WHEELER, 2005).

Em termos práticos, o colo da bexiga pode ser considerado a porção proximal da uretra. O músculo liso da uretra é inervado principalmente pelo nervo hipogástrico e, com frequência, é considerado como um esfíncter interno, embora não seja um esfíncter verdadeiro. O esfíncter externo da uretra é composto de músculos estriados que circundam a uretra distal. O esfíncter externo da uretra é inervado pelo nervo pudendo, que é um nervo motor somático cujos corpos celulares se localizam em segmentos sacrais da medula espinhal (principalmente S1 e S2). Os principais receptores para a inervação eferente da uretra são:

- Receptores alfa-adrenérgicos: receptores simpáticos inervados pelo nervo hipogástrico. O estímulo desses receptores induz à contração do músculo liso do colo da bexiga e da uretra. Essa contração muscular se contrapõe ao fluxo urinário pela uretra e, desse modo, facilita o enchimento da bexiga.

- Receptores colinérgicos nicotínicos: receptores motores somáticos localizados no esfíncter externo da uretra e são inervados pelo nervo pudendo. O controle desse nervo é voluntário, porém os seus corpos celulares neuronais localizados na porção sacra da medula espinhal também recebem estímulo aferente involuntário (Figura 2). O estímulo desses receptores induz à contração do esfíncter, facilitando o enchimento da bexiga (SHARP e WHEELER, 2005).

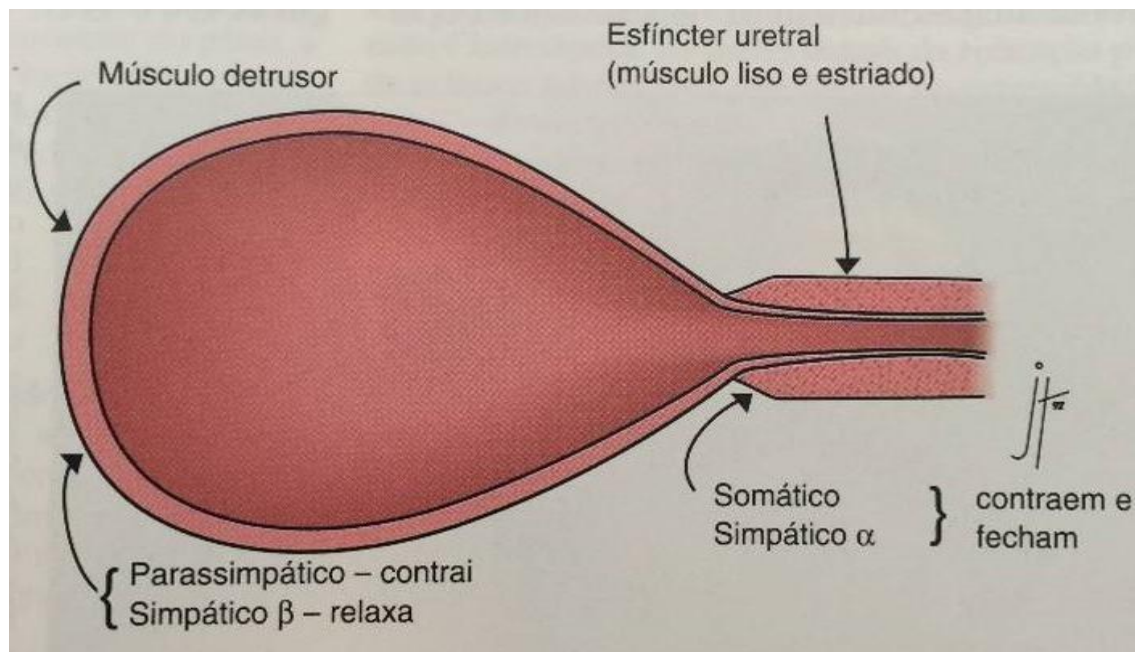


Figura 2- Esquema da inervação da bexiga urinária e uretra. (SHARP e WHEELER, 2005).

De modo semelhante à bexiga, a parede da uretra contém receptores sensitivos que transmitem informação a respeito da distensão (estiramento), de dor e do fluxo urinário. Esses receptores são inervados por axônios aferentes que passam pelo nervo pudendo e alcançam os segmentos sacrais da medula espinhal (FERNÁNDEZ e BERNARDINI, 2010; PRADA, 2014).

2.2.2 Vias neurais envolvidas no preenchimento da bexiga

O preenchimento da bexiga resulta da constante chegada de urina pelos ureteres. Ao contrário do que pode parecer, é um processo ativo, pois o relaxamento e consequente distensão da bexiga urinária depende de um mecanismo ativo a cargo do sistema nervoso simpático. Os neurônios pré-ganglionares simpáticos encontram-se na coluna lateral dos segmentos L1-L4 da substância cinzenta da medula espinhal e seus axônios abandonam a medula pela raiz ventral dos nervos espinhais. Via ramo comunicante branco chegam ao tronco simpático e então se dirigem ao plexo aorticoabdominal onde fazem sinapse no gânglio mesentérico caudal. Os axônios dos neurônios pós-ganglionares formam os nervos hipogástricos esquerdo e direito que contribuem para a formação do plexo pélvico, terminando em receptores beta da parede da bexiga, inibindo o tônus da musculatura lisa e em receptores alfa do colo da bexiga, incrementando o tônus da musculatura lisa (FERNÁNDEZ e BERNARDINI, 2010; PRADA, 2014).

2.2.3 Via aferente da sensação de plenitude vesical

À medida que a bexiga vai se distendendo, passam a ser estimulados receptores sensoriais localizados em sua parede, sendo essa informação transmitida pelo nervo pélvico à raiz dorsal dos nervos espinhais dos segmentos S1-S3 a medula espinhal. Essas fibras sensitivas efetuam sinapses com:

- Interneurônios que se comunicam ao sistema propioceptivo multissináptico dos fascículos próprios e alcançam os corpos dos neurônios simpáticos dos segmentos L1-L4 e os corpos dos neurônios motores somáticos do corno ventral da substância cinzenta da medula espinhal, denominado neurônio motor inferior (NMI), cujo axônio irá inervar o músculo uretral (somático voluntário) que funciona à maneira de esfíncter favorecendo a retenção urinária. Estabelece-se, assim, um arco reflexo relacionado ao mecanismo de preenchimento da bexiga.
- Interneurônios que fazem sinapse inibitória com neurônios pré-ganglionares parassimpáticos de segmentos sacrais da medula espinhal, envolvidos no mecanismo de esvaziamento da bexiga.

- Neurônios da formação reticular que transmitem a sensação de plenitude ao tronco encefálico, ao cerebelo, e ao tálamo, por uma via espinorreticular.
- Neurônios que formam o trato espinotalâmico e constituem, com a formação reticular, uma via de acesso bilateral ao tálamo e centros superiores.

Assim, tende-se a ideia de que a sensação de plenitude tem caráter proprioceptivo, pois resulta do grau de distensão das fibras lisas que compõem a parede da bexiga (músculo detrusor), sendo transmitida por uma via espinorreticular ao tronco encefálico (PELLEGRINO, 2003; PRADA, 2014).

De Lahunta et al. (2009) afirmam que essa sensação é transmitida ao tronco encefálico pelo fascículo grácil. Por sua vez, a sensação de plenitude acompanha a sensação de desconforto nos estados de intenso preenchimento da bexiga, sensação esta que é transmitida, via trato espinotalâmico, aos centros superiores.

Uma vez atingido determinado grau de distensão da parede da bexiga urinária, essa informação chega ao tálamo, pelas vias neurais já consideradas e em seguida ao córtex cerebral, tornando-se consciente. A região sensorial cortical específica para o músculo detrusor encontra-se no córtex frontal, em correspondência ao joelho do corpo caloso (PRADA, 2014).

2.2.4 Mecanismo de esvaziamento da bexiga urinária

Existem duas vias motoras que se acham implicadas no mecanismo de esvaziamento da bexiga, sendo uma motora somática voluntária, que se inicia no córtex motor e termina no músculo uretral (esfíncter somático) e outra motora visceral parassimpática que se inicia no hipotálamo e termina no músculo detrusor da parede da bexiga. Esses dois centros mantêm interconexões com a área cortical pré-frontal (transdutora de estados psíquicos) e com estruturas do sistema límbico (relacionado à expressão de comportamentos acompanhados de emoções), motivo pelo qual o mecanismo da micção sofre profundas influências de estados psíquicos e emocionais. Esses centros mantêm ainda conexões com núcleos do sistema somático extrapiramidal e áreas da formação reticular do tronco encefálico, conhecidas como centros motores detrusores subcorticais.

A partir do tronco encefálico, os impulsos corticais voluntários para a micção alcançam, com atuação inibitória, os corpos dos neurônios motores somáticos da coluna ventral dos segmentos sacrais da substância cinzenta da medula espinhal. Os axônios desses neurônios motores inferiores (NMI) chegam diretamente ao músculo uretral, inibindo seu tono, promovendo, portanto, o seu relaxamento e permitindo, assim, o fluxo da urina pelo canal uretral. Por sua vez, a ação autonômica do hipotálamo no processo de esvaziamento da bexiga também se vale das suas conexões com a formação reticular e, via trato reticuloespinhal, alcança os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados na porção lateral da lâmina VII, nos segmentos S1-S3 da substância cinzenta da medula espinhal. As fibras desses neurônios abandonam a medula espinhal pela raiz ventral dos nervos espinhais, formando os nervos pélvicos esquerdo e direito.

Em gânglios viscerais muito próximos à bexiga ou mesmo intramurais, efetuam sinapses com os neurônios pós-ganglionares, cuja atuação estimula a contração do músculo detrusor, iniciando-se assim, o processo de esvaziamento da bexiga. Nesse processo é importante considerar que as fibras lisas componentes do músculo detrusor dispõem-se na parede da bexiga e estendem-se para o seu colo, de tal maneira que, uma vez contraindo-se, dilatam sua luz, o que possibilita o fluxo da urina para fora da bexiga. Ao contrário da existência de um esfíncter de musculatura somática, constituído pelo músculo uretral, não existe um esfíncter correspondente de musculatura lisa no colo da bexiga. A própria disposição de fibras do músculo detrusor é que mantêm o colo fechado durante a etapa de preenchimento da bexiga (DELAHUNTA et al., 2009; LORENZ e KORNEGAY, 2011; PRADA, 2014).

Como mecanismo auxiliar, também pode ser acionada voluntariamente a participação dos músculos abdominais. Quanto à participação do cerebelo, aceita-se que ele tenha ação moduladora no processo de esvaziamento da bexiga (DELAHUNTA et al., 2009; LORENZ e KORNEGAY, 2011).

Além dessas estruturas cerebrais envolvidas no mecanismo de esvaziamento da bexiga (córtex motor e hipotálamo), é importante lembrar que esse processo também pode ocorrer por uma ação reflexa e automática,

envolvendo apenas a medula espinhal e a inervação periférica. Neste caso, os neurônios sensoriais procedentes da bexiga e que caminham pelos nervos pélvicos esquerdo e direito entram pela raiz dorsal dos nervos espinais da região sacral da medula espinhal e efetuam sinapse com interneurônios que passam a ter o seguinte comportamento:

- Incorporam-se ao sistema proprioceptivo multissináptico (fascículo próprio) para alcançarem os segmentos L1-L4 da medula espinhal, onde efetuam sinapse com os neurônios pós-ganglionares simpáticos localizados na coluna lateral da substância cinzenta, com ação inibitória sobre eles, isto é, impedindo a continuidade do processo de preenchimento da bexiga.

- Realizam-se sinapse com ação facilitatória, com os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos da porção lateral da lâmina VII da substância cinzenta dos segmentos sacrais da medula espinhal, estimulando, assim, a contração do músculo detrusor da bexiga. Efetuam sinapse com ação inibitória, com motoneurônios alfa do corno ventral da substância cinzenta dos segmentos sacrais da medula espinhal, que inervam o músculo uretral (estriado), relaxando-o e assim permitindo o fluxo de urina (PRADA, 2014; D'ANCONA, 2015).

Para finalizar esta sumária recapitulação anátomo-fisiológica será necessário lembrar que as vísceras, quando privadas de seu sistema nervoso extrínseco — simpático e parassimpático — podem continuar a funcionar, graças aos plexos nervosos intramurais. A bexiga possui também um aparelho nervoso autônomo intraparietal capaz de, por meio de reflexos curtos, assegurar parcialmente o funcionamento do órgão quando este estiver isolado do sistema nervoso central. São as células nervosas, uni ou multipolares, existentes em grande número na parede vesical, que constituem os pequenos centros nervosos periféricos, dos quais depende a autonomia do músculo liso vesical, quando este se achar desligado da medula. No entanto, esse funcionamento será imperfeito e insuficiente (LORENZ e KORNEGAY 2011; PRADA, 2014; D'ANCONA, 2015).

2.3 FISIOPATOLOGIA DA MICÇÃO

2.3.1 Distúrbios miccionais decorrentes de lesões intracranianas

Pellegrino (2003), De Lahunta et al. (2009) e Lorenz e Kornegay (2011), estudaram os distúrbios vesicais nas lesões cerebrais e concluíram que, para poder instalar-se um distúrbio da micção em indivíduos portadores de lesões cerebrais, é necessário que estas sejam bilaterais, ainda que somente funcionais e apenas comprovadas por alterações do eletroencefalograma. Nas lesões unilaterais é indispensável que o estado da consciência esteja bastante comprometido para que ocorram repercussões na micção. Esses autores encontraram, na maior parte dos doentes com lesões expansivas cerebrais unilaterais, diminuição da capacidade fisiológica da bexiga devido ao aumento do tono postural, e acentuada contratilidade, característica da bexiga não inibida; entretanto, mediante estudos eletroencefalográficos, verificaram que a disfunção vesical só se manifesta quando existe comprometimento pelo menos funcional de ambos os hemisférios, ou quando estejam alteradas as estruturas profundas diencefálicas, sede de importantes centros da representação vegetativa vesical. Esses autores não puderam fazer correlação exata entre o local da lesão expansiva e o caráter e intensidade da disfunção vesical.

2.3.2 Sinais clínicos relacionados a lesões das vias neurais envolvidas no controle da micção

Apresentam diferenças os sintomas relacionados a lesões dos centros superiores com aqueles decorrentes de lesões de estruturas periféricas.

2.3.2.1 Lesões de centros superiores (neurônios motores superiores – NMS).

São os seguintes os sinais mais característicos:

- Perda do controle voluntário da micção;
- Perda da sensação de repleção vesical;
- Retenção urinária e distensão vesical;
- Hipertonia do esfíncter uretral (somático);

- Eliminação da urina em gotas ou pequenos jatos;
- Permanência de pequeno resíduo de urina, após o esvaziamento da bexiga.

De modo geral, em poucos dias o reflexo se restabelece, havendo parcial eliminação de urina. Nestes casos, ajudaria bastante a atuação da pressão abdominal, o que no ser humano consciente é investido como recurso auxiliar. Este quadro é conhecido como “bexiga automática ou espinal”, pois o esvaziamento do reservatório depende da integridade do arco reflexo (SHARP e WHEELER, 2005; PRADA, 2014).

2.3.2.2 Lesões periféricas (neurônios motores inferiores - NMI)

São os seguintes os sinais mais característicos:

- Perda de arco reflexo;
- Bexiga denervada – arreflexia;
- Perda de controle voluntário;
- Eliminação por reflexo intramural (o músculo liso quando denervado não se atrofia);
- Incontinência, grande resíduo de urina após micção;
- Hipotonia do esfíncter uretral (somático).

Este quadro é conhecido como “bexiga autônoma” (SHARP e WHEELER, 2005; PRADA, 2014).

O controle da micção envolve diversas estruturas neurais e inclusive fatores emocionais caracterizando-se, portanto, como mecanismo complexo sobre o qual não há absoluto consenso na literatura pertinente. Entretanto, vale considerar que o conceito de arreflexia do músculo detrusor em lesões do NMS sobre os segmentos lombares, ainda que amplamente empregado, não é correto, uma vez que o reflexo de esvaziamento implica principalmente os segmentos sacrais, e se estes não se encontram lesados, o reflexo permanece. Também não é correto empregar os conceitos de NMS e NMI quando nos referimos ao SNA (PRADA, 2014).

Concluindo, a perda da capacidade de esvaziamento da bexiga deve-se principalmente à lesão do NMS sobre o músculo estriado uretral e a perda de sensação de plenitude, nos centros superiores, por interrupção das vias conscientes de acesso (DE LAHUNTA, 2009; LORENZ e KORNEGAY, 2011).

2.4 CISTOMETRIA EM CÃES

A cistometria é o registro da pressão vesical durante a fase de enchimento.

As primeiras medidas da pressão vesical foram realizadas por Mosso e Pelacani em 1881, e somente em 1927 iniciou-se o enchimento artificial da bexiga. Na década de 1950 começou-se a utilizar aparelhos delicados ao estudo urodinâmico e nos anos 1980 e 1990, com a incorporação do computador, houve um grande avanço dos aparelhos (PLATT e OLBY, 2013; D'ANCONA, 2015).

A pressão vesical (P_{ves}) é o registro da pressão dentro da bexiga e representa a pressão da bexiga acrescida da pressão abdominal (P_{abd}). A medida pode ser feita através de cateter uretral ou suprapúbico, conectado a transdutor de pressão, que amplifica o sinal e é registrado no aparelho de urodinâmica. (DE LAHUNTA et al., 2009; D'ANCONA, 2015).

A bexiga tem a propriedade de armazenar grande volume à baixa pressão, e à medida que vai sendo realizado o enchimento vesical, ocorre pequeno aumento da pressão. Inicialmente aumenta a P_{ves} devido à resistência viscoelástica à distensão vesical. Continuando o enchimento, verifica-se discreto aumento da P_{ves} com grande aumento de volume. Quando atinge a capacidade vesical máxima, ocorre discreto aumento da P_{ves} devido ao estiramento das fibras colágenas da bexiga (PLATT e OLBY, 2013).

Durante a cistometria, com a mobilização do paciente, ocorre aumento da P_{ves} e para confirmar se tem alguma atividade do detrusor é necessário medir a pressão abdominal (P_{abd}). A P_{abd} é registrada através de um cateter com balão na extremidade, induzido no reto. O balão é utilizado para que o material fecal ou a mucosa retal não obstrua o orifício do cateter, portanto o balão não deve exercer

pressão. A pressão vesical menos a pressão abdominal é igual a pressão do detrusor (P_{det}). O cateter de balão é preenchido com líquido, com o cuidado de retirar as bolhas de ar [$P_{det} = P_{ves} - P_{abd}$] (D'ANCONA, 2015).



Figura 3. Cão submetido à avaliação cistométrica.

2.4.1 Parâmetros

Através da cistometria obtêm-se as seguintes informações:

- Atividade do detrusor;
- Capacidade vesical;
- Complacência vesical;
- Sensibilidade vesical (GOLDSTEIN e WESTROPP, 2005).

2.4.2 Detrusor normal

Durante a fase de enchimento vesical a P_{ves} mantém-se baixa e não são observadas contrações involuntárias do detrusor, mesmo após manobras provocativas. O detrusor normal também é chamado de “estável” (GOLDSTEIN e WESTROPP, 2005; DE LAHUNTA et al., 2009).

2.4.3 Detrusor Hiperativo

Caracteriza-se por apresentar contrações involuntárias que podem ser espontâneas ou desencadeadas por manobras provocativas que o paciente não consegue inibir. Quando as contrações involuntárias estão relacionadas com lesão neurológica, considera-se como hiperreflexia do detrusor e nos casos em que não existe lesão neurológica denomina-se instabilidade do detrusor (GOLDSTEIN e WESTROPP, 2005; GROAT e YOSHIMURA, 2012; D'ANCONA, 2015).

As manobras provocativas incluem enchimento rápido, mudança de decúbito, tossir, pular e outras. Nos pacientes com lesão neurológica muitas vezes as contrações são assintomáticas. Nos pacientes sem lesão neurológica, apresentam sintoma de polaciúria, nictúria, urgência urinária. Caso o paciente sem lesão neurológica não tenha sintomas, não deve ser considerado o diagnóstico de instabilidade do detrusor. No passado considerava-se que as contrações deveriam ser maiores de 15cmH₂O, atualmente considera-se valor menor, mas não está padronizado (GOLDSTEIN e WESTROPP, 2005; DE LAHUNTA et al., 2009; D'ANCONA, 2015).

2.4.4 Capacidade vesical

Representa a capacidade de urina que a bexiga pode conter. No cão adulto a capacidade normal varia de 6-10ml/kg. Para saber a capacidade vesical antes de realizar a cistometria, é esvaziada a bexiga urinária por sondagem (GOLDSTEIN e WESTROPP, 2005).

2.4.5 Complacência vesical (C)

É a capacidade da bexiga de armazenar urina sob baixa pressão. A complacência é medida através da divisão do volume infundido pela diferença de pressão vesical ou do detrusor.

$$C = \frac{(V_1 - V_0)}{(P_1 - P_0)}$$

$V_1 - V_0 \rightarrow V_1$ é o volume infundido na bexiga, e V_0 é o volume que está na bexiga no início do exame.

$P_1 - P_0 \rightarrow P_1$ é a pressão no final da fase de enchimento vesical e P_0 a pressão no início do exame.

Considera-se complacência normal quando a resultante for maior de 10ml/cm de H_2O , mas os valores absolutos ainda não estão bem estabelecidos. Baixa complacência é quando a bexiga perde a capacidade de distensibilidade e a resultante é menor de 10ml/cm H_2O (GOLDSTEIN e WESTROPP, 2005; PLATT e OLBY, 2013; D'ANCONA, 2015).

2.4.6 Sensibilidade vesical

É um dado subjetivo e difícil de ser avaliado. Geralmente a sensibilidade é avaliada durante a fase de enchimento vesical, o cão mostra-se agitado e precede contrações vigorosas abdominais e micção (LORENZ e KORNEGAY 2011).

2.5 CONCLUSÃO

A cistometria permite o registro contínuo da relação volume/pressão na bexiga urinária durante a fase de enchimento vesical. É indubitavelmente um importante meio para avaliar a complacência, sensibilidade, capacidade vesical e as pressões vesicais, abdominais e detrusoras. Isso nos indica se o paciente possui ou se recuperou funcionalidade vesical e/ou esfinteriana.

2.6 REFERÊNCIAS

CHRISMAN, C.; MARIANI, C.; PLATT, S.; CLEMMONS, R. **Neurologia para o Clínico de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2005, p. 185-202.

D'ANCONA, C. A. L. **Avaliação Urodinâmica e suas aplicações clínicas**. São Paulo: Atheneu, 2015, p. 53-60.

DELAHUNTA, A. **Veterinary Anatomy and Clinical Neurology**. Missouri: Saunders Elsevier, 2009, p. 168-191.

DEWEY, C. W. **Neurologia de Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2006, p. 209-214.

FAWCETT, J. W.; CURT, A.; STEEVES, J. D.; COLEMAN, W. P.; TUSZYNSKI, M. H.; LAMMERTSE, D.; BARTLETT, P. F.; BLIGHT, A. R.; DIETZ, V.; DITUNNO, J.; DOBKIN, B. H.; HAVTON, L. A.; ELLAWAY, P. H.; FEHLINGS, M. G.; PRIVAT, A.; GROSSMAN, R.; GUEST, J. D.; KLEITMAN, N.; NAKAMURA, M.; GAVIRIA, M.; SHORT, D. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: spontaneous recovery after spinal cord injury and statistical power needed for therapeutic clinical trials. **Spinal Cord**. v. 45, p. 190–205. 2007.

GROAT, W. C.; YOSHIMURA, N. Plasticity in reflex pathways to the lower urinary tract following spinal cord injury. **Experimental Neurology**. v.235, n. 1, p. 123-132. 2012.

FERNÁNDEZ, V. L.; BERNARDINI, M. **Neurologia em Cães e Gatos**. São Paulo: MedVet, 2010, p. 425-430.

FITZMAURICE, S. N. **Neurologia em Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 181-183.

GOLDSTEIN, R. E.; WESTROPP, J. L. Urodynamic testing in the diagnosis of small animal micturition disorders. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. v.20, p.65-72. 2005.

GROAT, W. C.; YOSHIMURA, N. Plasticity in reflex pathways to the lower urinary tract following spinal cord injury. **Experimental Neurology**. v.235, n. 1, p. 123-132. 2012.

LORENZ, M. D.; KORNEGAY, J. N. **Handbook of Veterinary Neurology** - Fourth Edition. Missouri: Saunders. 2011, p. 75-90.

OLBY, N.; LEVINE, J.; HARRIS, T.; MUNANA, K.; SKEEN, T.; SHARP, N. Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996–2001). **Journal American Veterinary Medical Association**. v. 222, p. 762-769. 2003.

PELLEGRINO, F.; SURANITI, A.; GARIBALDI, L. **Síndromes Neurológicas em Cães e Gatos – Avaliação clínica, Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Interbook, 2003, p. 129-139.

PLATT, S.; OLBY, N. **Manual of Canine and Feline Neurology** - 4th edition. London: British Small Animal Veterinary Association. 2013. p. 383-389.

PRADA, I. **Neuroanatomia Funcional em Medicina Veterinária com correlações clínicas**. São Paulo: Ed. Terra Molhada. 2014, p. 463-524.

SHARP, N. J. H.; WHEELER, S. J. **Small animal spinal disorders: Diagnosis and Surgery**. 2ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005, p. 81-91.

CAPÍTULO 2

3 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA SENSIBILIDADE, MOTRICIDADE E MICÇÃO APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ALÓGENAS EM CÃES COM LESÃO MEDULAR (*Evaluation sensitive, motor and cystometric of dogs with medullary lesion submitted to mesenchymal stem cell transplantation*).

RESUMO

O traumatismo na medula espinhal causa perdas motoras e sensitivas, alterações no funcionamento do sistema urinário, além de comprometimento intestinal, respiratório, circulatório, sexual e reprodutivo. As células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco adultas, e foram descritas como células precursoras dos fibroblastos da medula óssea. A caracterização destas células engloba um conjunto de características morfológicas, fenotípicas e funcionais. As principais funções das CTM são a manutenção e renovação de tecidos mesenquimais adultos, além da capacidade de diferenciação, estas células apresentam efeitos parácrinos via secreção de fatores de crescimento, citocinas, mediadores anti-fibróticos ou angiogênicos. O estudo da terapia celular no trauma medular reveste-se de grande importância por se tratar de lesão ainda considerada como intratável e incurável. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos das células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA) em cães com lesão medular toracolombar crônica através de exame neurológico para avaliar a sensibilidade cutânea e esquelética, deambulação e avaliação cistométrica.

Palavras-chave: Sistema urinário. Células-tronco mesenquimais. Terapia celular. Cão. Avaliação cistométrica.

ABSTRACT

Trauma to the spinal cord causes motor and sensory loss, abnormal functioning of the urinary system, and intestinal, respiratory, circulatory, sexual and reproductive impairment. Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells, and have been described as precursor cells of the bone marrow fibroblasts. The characterization of these cells comprises a collection of morphological, phenotypic and functional characteristics, the main functions of the MSC are maintenance and renewal of adult mesenchymal tissues, beyond the capacity of differentiation, these cells exhibit effects via paracrine secretion of growth factors, cytokines, fibrotic or anti-angiogenic agents. The study of cell therapy in spinal cord trauma is of great importance because it is injury still considered untreatable and incurable. This study aimed to evaluate the effects of stem cells derived from adipose tissue (CTDA) in dogs with chronic spinal cord injury thoracolumbar through neurological examination to assess the skin and esquelética sensitivity, walking and cystometric evaluation.

Keywords: Urinary system. Mesenchymal stem cells. Cell therapy. Dog. Cystometric evaluation.

3.1 INTRODUÇÃO

A principal causa de consulta neurológica em animais de companhia é o traumatismo medular (GREEN e BOSCO, 2008; OSAKO et al., 2008), cuja gravidade depende da velocidade, do grau e da duração da lesão compressiva (SOUZA et al., 2009).

A extensão do dano mecânico primário varia amplamente em significado, ocorrendo desde a ruptura completa da medula espinhal em fraturas vertebrais deslocadas até a lesão mínima em certas herniações discais (TOOMBS e WATERS, 2007). Os déficits neurológicos em consequência da lesão aguda da medula espinhal podem resultar de secção mecânica (lesão primária) das vias neuronais imediatamente após o trauma, assim como de lesão tecidual tardia (secundária) que ocorre em um período de minutos a dias após a primária. Essas lesões tardias relacionam-se ao desencadeamento de uma cascata de eventos destrutivos sistêmicos, locais, celulares, que promovem isquemia, hipóxia, edema e diversos eventos bioquímicos prejudiciais à medula espinhal (OSAKO et al., 2008).

O traumatismo na medula espinhal causa perdas motoras e sensitivas, alterações no funcionamento do sistema urinário, além de comprometimento intestinal, respiratório, circulatório, sexual e reprodutivo (LIANZA et al., 2001; PARK et al., 2012). As lesões medulares em nível torácico e lombar resultam em disfunções do trato urinário inferior, como a hiperatividade da bexiga urinária, dissinergia vesico-esfincteriana e retenção urinária (FORNER, 2011).

Diversas pesquisas têm explorado o potencial da terapia celular, utilizando o transplante de vários tipos de células, como as células de Schwann (BIERNASKIE et al., 2007; SABERI et al., 2008), células-tronco neurais (SCHULTZ, 2005; TARASENKO et al., 2007; PARR et al., 2008), células-tronco mesenquimais (CHOPP et al., 2000; OSAKA et al., 2010), fibroblastos (TOBIAS et al., 2003; WONG et al., 2008) e células olfativas (PEARSE et al., 2007; GUEST et al., 2008).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco adultas, e foram descritas como células precursoras dos fibroblastos da medula óssea

(FRIEDENSTEIN et al., 1970). A caracterização destas células engloba um conjunto de características morfológicas, fenotípicas e funcionais (DOMINICI et al., 2006). Elas devem ser aderentes, apresentar morfologia alongada semelhantes aos fibroblastos e expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90 com ausência de expressão de CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR. Funcionalmente devem ter o potencial de diferenciação em pelo menos três linhagens celulares: adipócitos, condrócitos e osteoblastos (DOMINICI et al., 2006).

As principais funções das CTM são a manutenção e renovação de tecidos mesenquimais adultos (CAPLAN, 2009). Além da capacidade de diferenciação, estas células apresentam efeitos parácrinos via secreção de fatores de crescimento, citocinas, mediadores anti-fibróticos ou angiogênicos (DJOUAD et al., 2009).

As CTM apresentam baixa imunogenicidade e podem ser utilizadas de forma alogênica sem problemas com a rejeição (MINGUELL et al., 2000; DAI et al., 2005; FRASER et al., 2006; JIANG et al., 2006; GHANNAM, et al., 2010).

As CTM podem ter efeito anti-inflamatório no local da lesão, pois reprimem a vigilância imunológica e inibem a destruição mediada pelas células T e B no sítio danificado (KOLOSSOV et al., 2005). A imunossupressão mediada pelas CTM é devido à liberação de fatores solúveis e ao contato célula-célula, essencial para a sua função inibidora (SELMANI et al., 2008).

As CTM têm potencial de diferenciação em diferentes linhagens como óssea, cartilaginosa, adiposa, muscular, hepática, endotelial, epitelial e neurogênica (FERRARI et al., 1998; MEZEY et al., 2000; DENIS e CAPLAN, 2004; BARREIRA, 2005; KUMAR et al., 2005; KOERNER et al., 2006; MCINTOSH et al., 2006; MEIRELES et al., 2006; MIAO et al., 2006; BROOKE et al., 2007; HU et al., 2007; NIE et al., 2007; NIXON et al., 2008; DAI et al., 2009). Esta capacidade de diferenciação torna as CTM excelentes candidatas para utilização na terapia celular.

Estudos mostram que as CTM podem ser obtidas de diferentes fontes (NOTH et al., 2002; SABATINI et al., 2005; SHI et al., 2005; CRIGLER L et al.,

2007). A mais comum é a medula óssea, porém Zuk et al. (2002), Pittenger e Martin (2004) observaram células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA). As vantagens das CTDA são: alta frequência no tecido (0,5%), fácil obtenção (DE UGARTE et al., 2003; MUSINA et al., 2005) e potencial de proliferação superior ao das células-tronco derivadas da medula óssea (LEE et al., 2004; KIM et al., 2007). Assim, as CTDA também podem ser utilizadas na medicina regenerativa (PUISSANT et al., 2005; BAI et al., 2007; HERRERO et al., 2012).

As CTM são facilmente isoladas, cultivadas e multiplicadas in vitro, porém suas características ainda não estão totalmente definidas. De todas as formas de células-tronco adultas estudadas até o presente, são as que podem ser derivadas de várias localidades e ao mesmo tempo, têm a mais ampla capacidade de diferenciação e grande plasticidade (ZAGO e COVAS, 2004; NARDI e MEIRELES, 2006; BROOKE et al., 2007; SHI et al., 2010; GEBLER et al., 2012), desta forma podem ser utilizadas na terapia celular.

Existem evidências científicas favoráveis ao uso de células-tronco em doenças neurológicas (PAULA et al., 2005; PEREIRA, 2008). O uso de células-tronco em ratos com lesão medular revelou migração de células para o local lesionado (PAL et al., 2010) e redução da reação inflamatória (PARK et al., 2010). Silva et al. (2014) observaram em seus estudos que o transplante de células-tronco influenciou de forma benéfica a micção de ratos com lesão medular.

O estudo da terapia celular no trauma medular reveste-se de grande importância por se tratar de lesão ainda considerada como intratável e incurável. Devido ao ceticismo e controvérsias sobre o uso de células-tronco no trauma medular em diferentes espécies, inclusive no homem, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos das células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA) em cães com lesão medular toracolombar crônica através de exame neurológico para avaliar a sensibilidade cutânea e esquelética, deambulação e avaliação cistométrica.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Após exames clínicos e neurológicos, foram utilizados 11 cães adultos com lesão medular toracolombar crônica (superior a 30 dias), de ambos os sexos oriundos do atendimento clínico da Unidade Hospitalar de Animais de Companhia (UHAC) da PUCPR do Campus São José dos Pinhais. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da PUCPR, tendo como número de protocolo 931.

Os cães escolhidos apresentavam lesão de grau 2 a 5 da escala de Griffiths (1982), Tabela 1.

Tabela 1. Tabela representativa da escala de Griffiths, 1982.

ESCORE	SINAIS
1	Dor
2	Paraparesia, ataxia
3	Paraplegia
4	Paraplegia, incontinência urinária
5	Paraplegia, incontinência urinária, sem percepção de dor profunda

3.2.2 Avaliações sensitivas

Foram avaliadas as sensibilidades cutânea/dor superficial (compressão cutânea interdigital) e esquelética/dor profunda (compressão da falange proximal do quarto dedo) com pinça hemostática (Figura 4 e 5), e a equipe estabeleceu a seguinte classificação estabeleceu-se a seguinte classificação:

- 1- Presença de dores superficial e profunda;
- 2- Presença de dor superficial e ausência de dor profunda;
- 3- Ausência de dor superficial e profunda.



Figura 4 – Cão submetido à compressão cutânea interdigital.



Figura 5 – Cão submetido à compressão da falange proximal do quarto dedo

3.2.3 Avaliações laboratoriais

Foram realizados exames urinários através da coleta por cistocentese, guiados por ultrassonografia e hematológicos [hemograma e provas bioquímicas de ureia, creatinina, albumina, ALT (alanina aminotransferase) e FA (fosfatase alcalina) através da coleta de sangue da veia jugular, esses exames foram feitos para avaliação pré-anestésica, para avaliar se os animais estariam aptos para a realização do transplante. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da UHAC da PUCPR, onde foram realizados todos os exames.

3.2.4 Avaliações cistométricas

Para a avaliação cistométrica, foi utilizado o aparelho da marca Dynamed®, modelo Dynapack MPX816 equipado com um sensor para volume infundido e obedeceu à padronização da ICS (*International Continence Society*), adaptada para cães adultos. Os dados referentes ao estudo cistométrico, basearam-se nas análises das pressões vesical, abdominal e detrusora, em três períodos: 1) Avaliação pré-transplante (momento que o proprietário consentiu a participação do seu cão no estudo); 2) Primeira avaliação pós-transplantes (30 dias após dois transplantes de células-tronco) e 3) Segunda avaliação pós-transplantes (60 dias após os dois transplantes de células-tronco).

Técnica de cistometria foi similar à usada por Goldstein e Westropp (2005) que resumidamente consiste em: após o animal ser contido e mantido em decúbito lateral esquerdo, um cateter com duplo lúmen de 7 fr (Figura 6) foi colocado de forma asséptica no interior da bexiga urinária do cão. Uma das aberturas do cateter esteve ligado ao transdutor de pressão da máquina, enquanto que a outra abertura foi utilizada para a administração de solução salina 0,9% na velocidade de 10-20mL/min. Em seguida foi inserida uma sonda retal de 6 fr com balonete na extremidade distal para aferição da pressão intrabdominal. Esta sonda foi inserida no ânus até o nível da sétima vértebra lombar, e nos casos que havia a presença de fezes estas foram manualmente removidas.



Figura 6 – Cateter uretral duplo lúmen 7 fr (Dynamed®).

3.2.5 Cultivo de CTDA de cães

O tecido adiposo (TA) utilizado para a obtenção de células-tronco foi obtido de cachorras híginas submetidas à ovariectomia eletiva na UHAC da

PUCPR. Os proprietários assinaram termo de consentimento da doação do material biológico.

O TA foi processado e as CTDA foram isoladas utilizando o método de digestão enzimática. Brevemente, o TA foi lavado com solução salina fosfatada (PBS - Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e feita uma digestão com 1 mg/mL de colagenase tipo I (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) durante 30 minutos a 37°C sob constante agitação, seguido por filtração utilizando filtro de 100 µm (BD FALCON™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA). A suspensão celular foi centrifugada a 800 g por 10 minutos e os eritrócitos contaminantes foram removidos após a lise com um tampão pH 7,3 (ZUK et al., 2002).

As células foram lavadas, filtradas novamente com filtro de 40 µm (BD FALCON™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA) e cultivadas numa densidade de 1×10^5 células/cm² em frascos de cultura com área de crescimento de 75 cm² (TPP, Trasadingen, Switzerland) em meio DMEM-F12 (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF -Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e 1% de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). As células foram mantidas em estufa com 5% de tensão de CO₂, 37°C e 95% de umidade. O meio foi trocado quatro dias após o plaqueamento inicial. O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana. Quando as culturas atingiram cerca de 80%-90% de confluência, as células foram dissociadas utilizando tripsina/EDTA 0,25% (Invitrogen™, NY, USA) e replaqueadas (passagem 1). Para o transplante celular, foram utilizadas células entre a terceira e quinta passagem.

3.2.6 Citometria de Fluxo

Para a caracterização imunofenotípica das CTDA, anticorpos comerciais foram utilizados para analisar a expressão de proteínas marcadoras na superfície celular de cães: CD45 e CD44 conjugados isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD90, CD29, CD34 e CD9 conjugados com ficoeritrina (PE); CD14 conjugado com alofococianina (APC) (BD Pharmingen, CA, USA) e CD8a conjugado com proteína peridina clorofila (PerCP) (BD Pharmingen, CA, USA). Para a marcação, as células foram lavadas com PBS e incubadas no escuro durante 30 minutos a

temperatura ambiente com o respectivo anticorpo. As células foram lavadas com tampão de lavagem e ressuspensas em 500 µL de uma solução contendo 1% de formaldeído. Anticorpos isotípicos de camundongo IgG1 foram utilizados como controle (BD Pharmingen, CA, USA). Aproximadamente cem mil células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) e foram analisadas por meio do *software* FlowJo (Flowjo, Ashland, USA).

3.2.7 Diferenciação celular

O potencial de diferenciação das CTDA foi avaliado pela indução da diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos. As células em terceira passagem (P3) foram incubadas com os meios de diferenciação.

3.2.7.1 Diferenciação adipogênica e osteogênica

CTDAs foram plaqueadas em triplicata, em duas placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland) sobre lamínulas. As células foram incubadas em estufa a 37°C, com 5 % de CO₂ até atingirem uma confluência de 80%. Foi adicionado 300µL de meio comercial para as diferenciações em adipócitos e osteoblastos (LONZA). A troca de meio foi realizada três vezes por semana durante três semanas. Após diferenciação adipocítica, pode ser visualizada pela presença de lipídeos no interior dos vacúolos, pela coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.). Brevemente, as células foram fixadas com Bouin (Biotec, Labmaster, Paraná, Brazil) durante 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas duas vezes com etanol a 70% e uma vez com água miliQ, e corado com uma solução de 0.5% de Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) durante 1 hora. Para coloração do núcleo foi utilizado Hematoxilina (Biotec, Labmaster, Paraná, Brazil).

Para a diferenciação osteogênica, após a fixação, foi adicionado às células Vermelho de Alizarina S por 15 minutos (Fluka Chemie, Buchs, UK) a temperatura ambiente para avaliar a presença de cristais de cálcio.

3.2.7.2 .Diferenciação condrogênica

Foi realizada a cultura em micromassa para a diferenciação condrogênica. Brevemente 5×10^5 células em 0,5 mL de meio de cultura foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos, em um tubo cônico para formar um botão celular. Foi adicionado 500 µL de meio de diferenciação condrogênica (CAMBREX) e as células foram cultivadas durante 21 dias. O meio foi trocado três vezes por semana. Após este período, o agregado celular foi fixado com 10% de formaldeído durante 1 hora a temperatura ambiente, desidratado com diluições seriadas de etanol e emblocadas em blocos de parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram corados com solução de Azul de Toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para demonstrar a presença de mucopolissacarídeos na matriz intracelular.

As células controle foram mantidas com meio IMDM suplementado com 15% de soro bovino fetal durante 21 dias.

3.2.8 Viabilidade das CTDA

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante vital Azul de Tripan (Sigma Aldrich, USA).

3.2.9 Protocolo anestésico

A medicação pré-anestésica foi realizada por meio de injeção intramuscular de midazolan na dose de 0,2mg/kg. Em seguida, os cães foram submetidos a anestesia geral mediante injeção intravenosa de propofol na dose de 5mg/kg. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano a 3% em circuito anestésico fechado, com oxigênio a 100%.

3.2.10 Transplantes de CTDA no espaço epidural

Foram transplantados $13,52 \times 10^6$ CTAD no sétimo e décimo quarto dias após a primeira avaliação cistométrica. O número de células usado foi baseado em extrapolação alométrica dos estudos de Villanova (2013) e Silva et al. (2014). As CTDA eram da terceira a quinta passagens, foram diluídas em 100 µL de meio

de cultura e foram injetadas no espaço epidural, a agulha foi acoplada a seringa de Hamilton.

A cada minuto 10 µL foi injetado, e após a injeção dos 100 µL, a agulha foi mantida no espaço epidural durante 5 minutos para impedir qualquer refluxo.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Dados epidemiológicos

Dos 11 cães participantes do estudo, 81% dos cães eram fêmeas sem raça definida (SRD), apresentando uma média de peso de 10,02kg. As lesões eram de diversas origens, desde hérnia discal a fraturas causadas por motivos desconhecidos. A maioria dos pacientes foram adotados já com a lesão, e muitos dos proprietários não souberam informar as causas e o tempo de lesão, relatavam o tempo que o animal foi adotado.

Tabela 2 – Dados Epidemiológicos dos cães que participaram do estudo.

Animal	Raça	Sexo	Peso	Tipo de Lesão	Tempo de Lesão
Cão 1	SRD	F	7,05 Kg	Fratura	1 ano
Cão 2	Poodle	M	8,0 kg	Fratura	1 ano
Cão 3	Daschund	M	9,450 kg	Hérnia	1 ano
Cão 4	SRD	F	9,5 kg	Fratura	6 meses
Cão 5	SRD	F	10,0 kg	Fratura	6 meses
Cão 6	SRD	F	9,60 kg	Fratura	2 anos
Cão 7	SRD	F	8,4 kg	Fratura	6 meses
Cão 8	SRD	F	11,30 kg	Fratura	10 meses
Cão 9	SRD	F	8,0 kg	Fratura	2 anos
Cão 10	Pittbull	M	29,0 kg	Fratura	3 meses
Cão 11	Bulldog Francês	M	14,30 kg	Hérnia	2 anos

Tabela 3 – Escores de grau de lesão e dor dos animais nos três momentos do estudo.

	Pré-transplante		30 dias após os transplantes		60 dias após os transplantes	
	Escores		Escores		Escores	
Animal	Grau de lesão	Dor	Grau de lesão	Dor	Grau de lesão	Dor
Cão 1	5	3	5	3	5	3
Cão 2	5	3	5	3	5	3
Cão 3	2	3	2	3	2	3
Cão 4	5	3	5	3	5	3
Cão 5	5	3	5	3	5	3
Cão 6	2	3	2	3	2	3
Cão 7	5	3	5	3	5	3
Cão 8	5	3	5	3	5	3
Cão 9	5	3	5	3	5	3
Cão 10	4	2	4	2	4	2
Cão 11	5	3	5	3	5	3

* Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as avaliações da lesão e também não houve diferença significativa ($p>0,05$) em relação a dor no momento das avaliações.

3.3.2 Avaliações laboratoriais

Os valores hematológicos, hemograma e provas bioquímicas de ureia, creatinina, albumina, ALT e FA, estavam dentro da normalidade conforme valores de referência citados por THRALL (2015).

Enquanto as avaliações por urinálise apresentavam cistite bacteriana com predominância de *Staphylococcus aureus* (30%) e *Escherichia coli* (46%), cujo antibiograma revelou sensibilidade à Enrofloxacina (72%) e Ceftriaxona (27%). Estando todos os animais avaliados cistometricamente sob tratamento específico. Incluir a comparação, antes e depois.

Por se tratar de uma doença que acomete animais paraplégicos, já era esperado que todos os animais possuísem cistite bacteriana, apesar do tratamento para bactéria específica, os animais tinham uma recorrência da cistite.

3.3.3 Análise imunofenotípica por citometria de fluxo

O volume médio de tecido adiposo obtido foi de 65 mL e o número médio de células após o isolamento foi de $25,75 \times 10^6$ células, com média de viabilidade celular de 94,91%.

A expressão dos antígenos de superfície nas CTDA's foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 1). As células foram positivas para os antígenos CD29, CD44, CD8a e CD9 e negativas para CD45, CD14, CD90 e CD34.

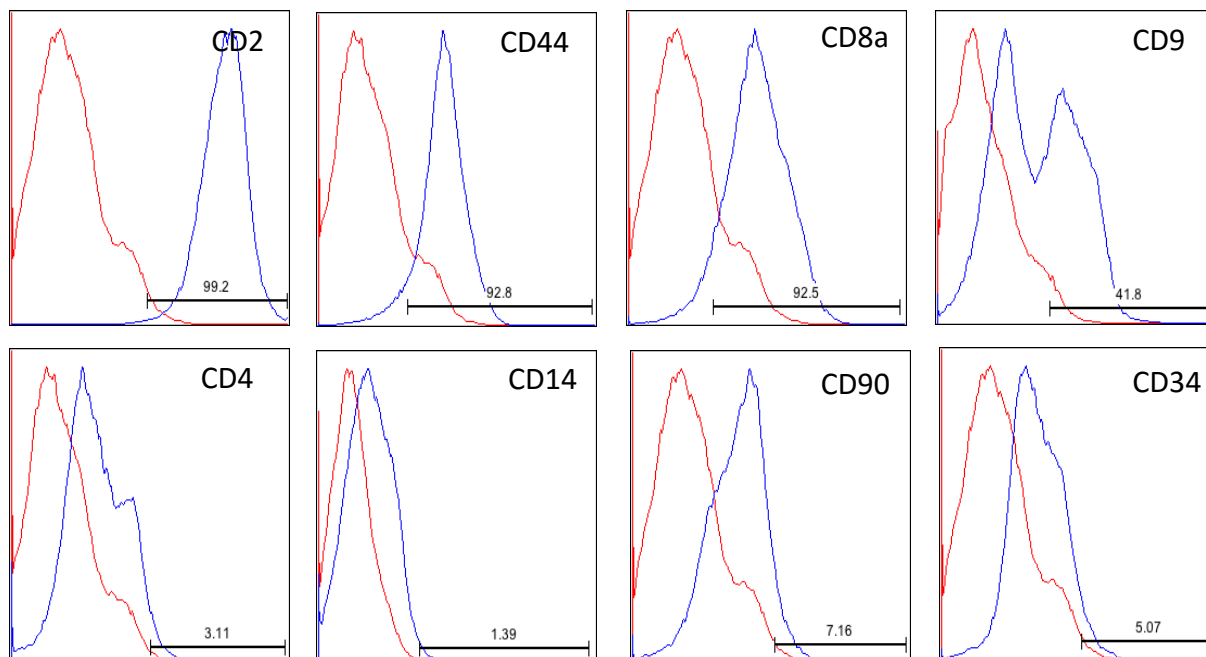


Figura 7. Análise imunofenotípica por citometria de fluxo. CTDA's foram marcadas com anticorpos contra os antígenos indicados (em azul). No histograma o controle isotípico está representado em vermelho.

A diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos foi avaliada pela morfologia e citoquímica. Na diferenciação adipogênica foram visualizados vacúolos lipídicos no interior das células induzidas a diferenciação. Nas células tratadas com meio de diferenciação osteogênica foi observada a presença de cristais de cálcio nas células. Nos ensaios de diferenciação condrogênica, as CTDA's formaram agregados que cresceram em suspensão em cultura. As culturas em micromassa geraram nódulos celulares, os quais produziram moléculas de matriz extracelular, relacionadas à cartilagem como o colágeno. Foram

observadas a presença de células cuboidais e lacunas ao redor dos condrócitos jovens.

As células controle, não demonstraram diferenciação espontânea após 21 dias de cultivo.

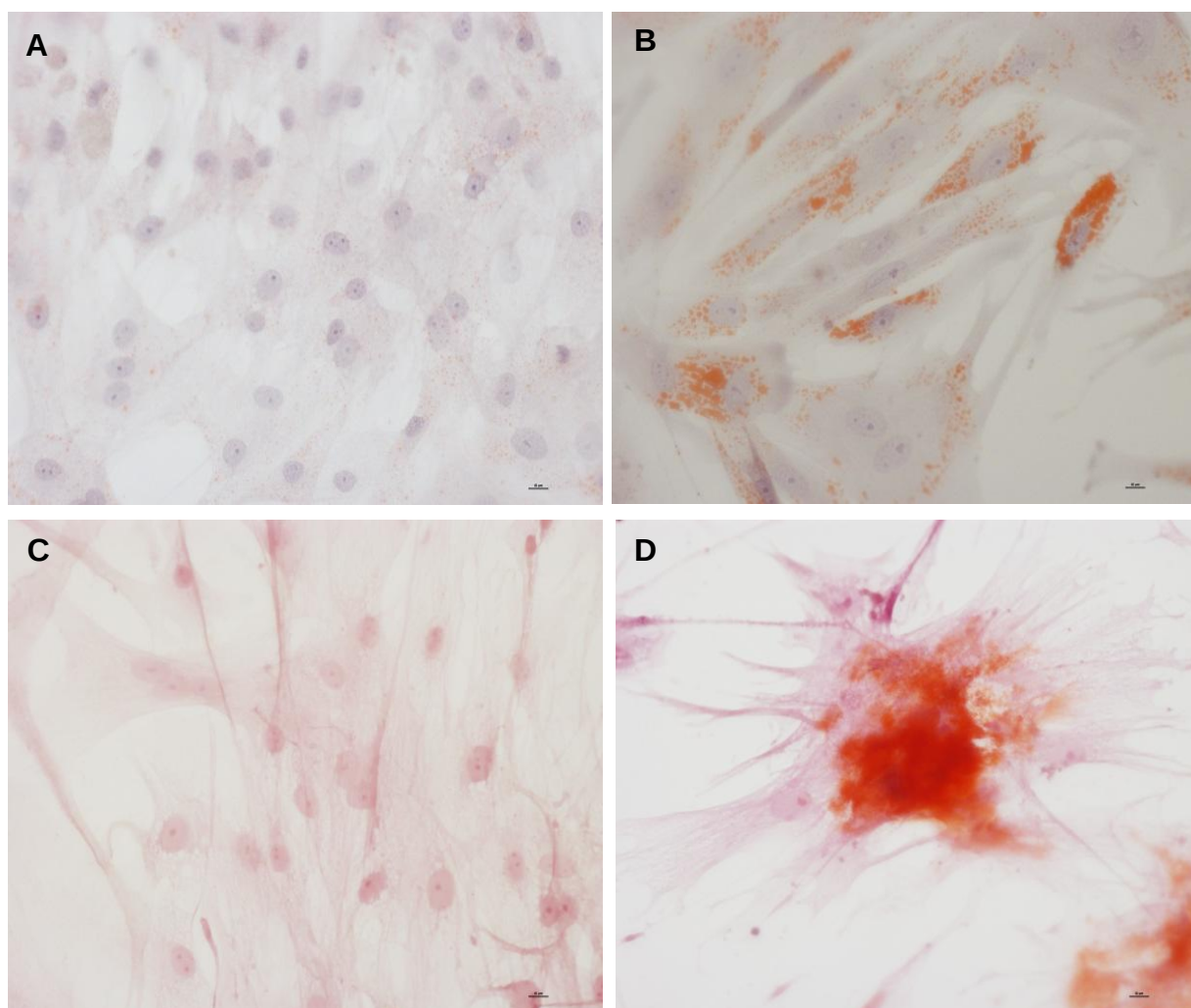


Figura 8. Diferenciação *in vitro* das CTDAs após 21 dias de cultivo. (A) Células controle. (B) Células diferenciadas a osteoblastos. Presença de depósito de cálcio corado com Vermelho de Alizarina S. (C) Células controle (D) Células diferenciadas a adipócitos, demonstrando a presença de vacúolos lipídicos no interior das células corados com Oil Red O. Aumento: 400x.

3.3.4 Avaliações cistométricas

Tabela 4 – Resultados dos exames cistométricos em cães com lesão toracolombar crônica. Resultados expressos em cmH₂O . (n=11)

	Pressão Vesical	Pressão Abdominal	Pressão detrusora
Pré-transplante	6,18 ± 2,5	-5,09 ± 10,5	11,18 ± 17,74
Após 1º transplante	8,45 ± 2,9	-3,27 ± 6,03	11,72 ± 14,05
Após 2º transplante	11,72 ± 3,4	-3,27 ± 7,24	15,0 ± 13,63

Os valores estão expressos em média±erro padrão da média;

- Teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey; teste de normalidade usado?

** Teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey;

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos/momentos (pós-teste de Tukey, p<0,05).

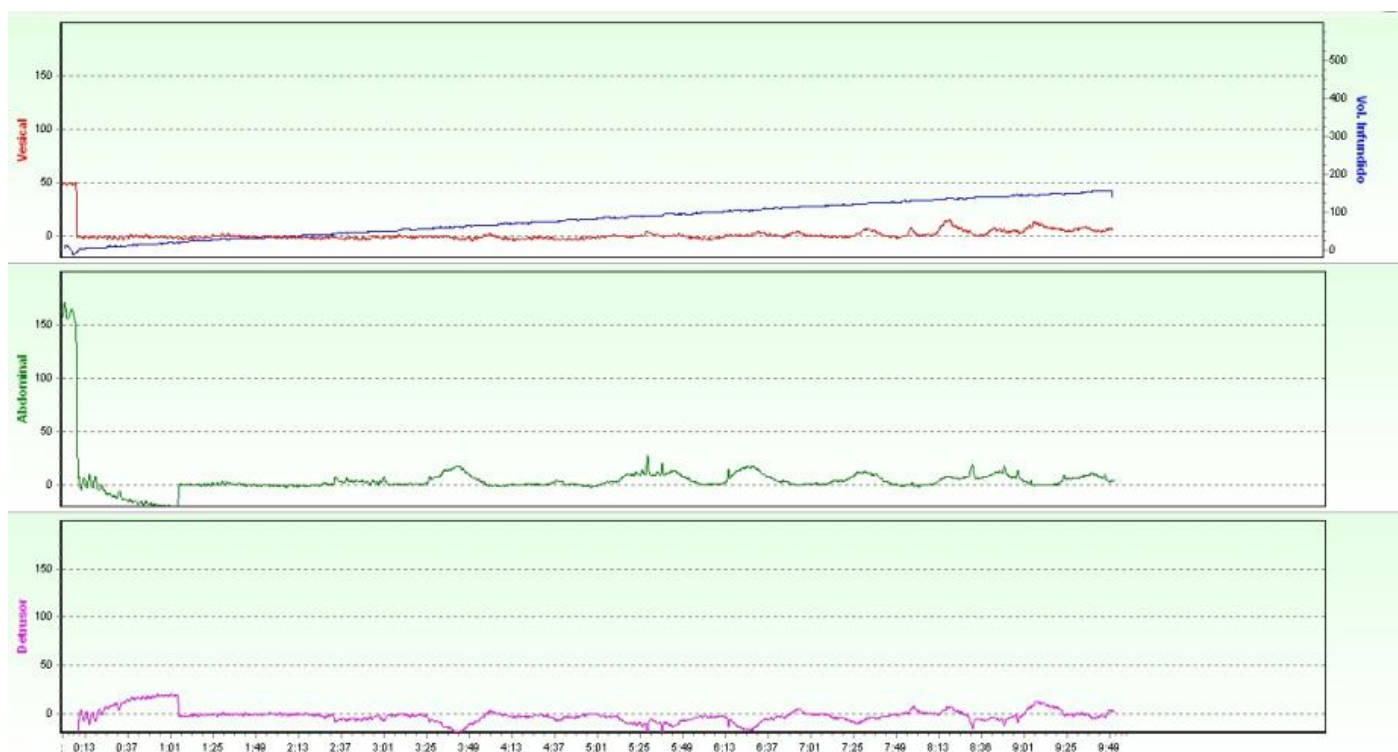


Figura 9 – Avaliação cistométrica em cão antes do transplante de células-tronco mesenquimais. No primeiro gráfico, a curva azul representa o volume infundido (mL) durante o exame, a curva em vermelho representa a pressão vesical (cmH₂O), no segundo gráfico, a curva verde representa a pressão abdominal (cmH₂O) e no terceiro gráfico a curva em roxo representa a pressão detrusora (cmH₂O).

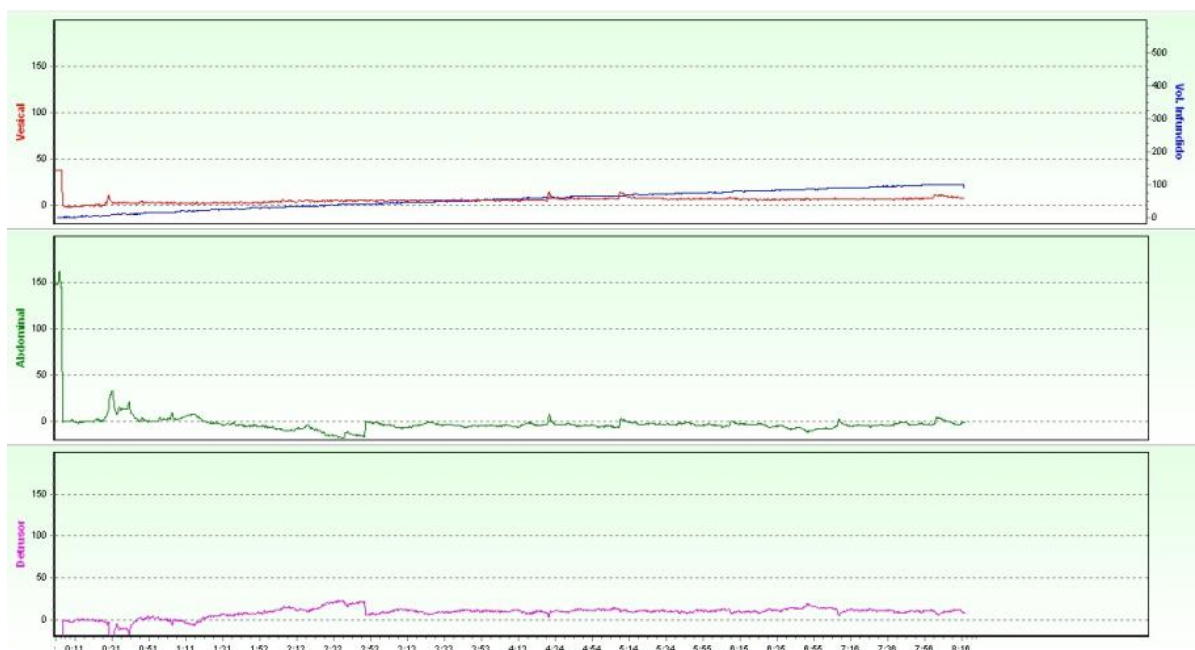


Figura 10 - Avaliação cistométrica em cão 30 dias após o transplante de células-tronco mesenquimais. No primeiro gráfico, a curva azul representa o volume infundido (mL) durante o exame, a curva em vermelho representa a pressão vesical (cmH₂O), no segundo gráfico, a curva verde representa a pressão abdominal (cmH₂O) e no terceiro gráfico a curva em roxo representa a pressão detrusora (cmH₂O).

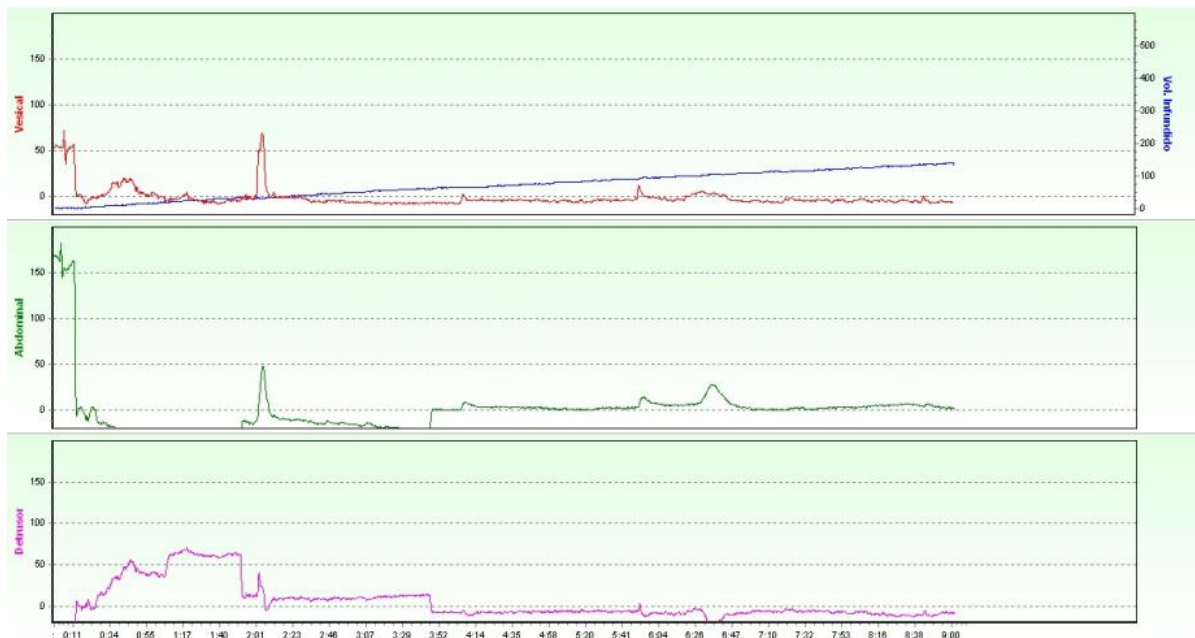


Figura 11- Avaliação cistométrica em cão 60 dias após o transplante de células-tronco mesenquimais. No primeiro gráfico, a curva azul representa o volume infundido (mL) durante o exame, a curva em vermelho representa a pressão vesical (cmH₂O), no segundo gráfico, a curva verde representa a pressão abdominal (cmH₂O) e no terceiro gráfico a curva em roxo representa a pressão detrusora (cmH₂O).

3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo os animais avaliados eram de ambos os sexos adultos jovens, apresentaram lesão medular grave, em região toracolombar, e conforme escala de Griffiths (1982) foram observados os graus mais severos, graus 4 e 5, que correspondem a significativa perda de motricidade, incontinência urinária e presença de dor profunda (grau 4) ou sua ausência (grau 5). As causas das lesões foram fraturas vertebrais e hérnias discais. Tais achados epidemiológicos correspondem aos observados por Mendes e Arias (2012), Dewey (2013) e Chaves et al. (2014).

A região vertebral toracolombar por ser o centro da coluna vertebral é a mais acometida por fraturas e consequente luxação e/ou subluxação vertebral com variado dano à medula espinhal (PELLEGRINO, 2010; MENDES e ARIAS, 2012), nesta região também é muito frequente hérnia de disco do tipo I de Hansen, que é decorrente de metaplasia condroide, e que ocasiona extrusão do núcleo pulposo, material que na maioria das vezes está na consistência caseosa e que invade o canal vertebral com consequente compressão medular, este tipo de hérnia é mais frequente em animais de três a seis anos de idade, e é mais comum entre as vértebras T11 a L3. Nesta região não há o ligamento intercapital que une as cabeças costais, e que serve de barreira mecânica para evitar o deslocamento de material discal para o canal vertebral (SHARP e WHEELER, 2005; SANTOS et al., 2012; DEWEY, 2013).

No presente estudo, as CTDA foram isoladas utilizando o método de digestão enzimática, conforme Strutt et al. (1996). As viabilidades celulares obtidas no primeiro e segundo transplantes estão de acordo com os estudos de Rebelatto et al. (2008).

Considerando que a dura-máter é uma meninge inexpandível, a aplicação intralésional de CTDA causaria maior dano ao tecido já comprometido, por isso foi optada a aplicação de CTDA no espaço epidural, corroborando com diferentes autores que fizeram uso desta via para transplante celular em diferentes espécies,

entre outros estão, Neuhuber et al. (2008), Pal et al. (2010), Park et al. (2010) e Villanova Jr (2013) em ratos, e Ryu (2012) e Penha et al. (2014) em cães.

Apesar da realização de dois transplantes de células-tronco alógenas derivadas do tecido adiposo (CTDA) foi observado neste estudo a manutenção dos déficits motores e nociceptivos, as fibras motoras e as responsáveis pela dor superficial estão presentes na região intermediária da medula espinhal, por isso é comum encontrarmos cães paraplégicos sem sensibilidade cutânea, enquanto que as fibras responsáveis pela dor profunda estão presentes na região central da substância branca, e em casos de lesões graves, elas podem estar rompidas (PELLEGRINO, 2003; PRADA, 2014).

Ryu et al. (2012) fizeram o uso de células-tronco em cães submetidos à compressão medular induzida com uso de cateter para embolectomia de French n.4, constataram aumento da regeneração axonal e recuperação funcional, em média oito semanas após o transplante. Esta recuperação foi acompanhada por aumento do número de fibras neuronais sobreviventes e neurofilamentos no local da lesão. Ocorreu significativa redução de IL-6 e de COX-2. Estes autores puderam concluir que o uso de células-tronco em cães com lesão medular aguda teve efeito anti-inflamatório, neuroprotetor e promoveu regeneração nervosa.

Diferente dos estudos de Ryu et al. (2012), a aplicação de CTDA neste estudo não foi logo após ter ocorrido a lesão, os pacientes não faziam parte de um grupo experimental, e a lesão não foi induzida, os cães do presente estudo tinham tempo de lesão que variou de três meses a dois anos, e não foi realizada análise histológica e de citocinas porque estes animais não seriam submetidos a eutanásia.

Segundo Fracaro (2014) a dosagem de citocinas em pacientes com lesão medular, deve ser obtida por análise de tecido medular, já que a análise do sangue não permite resultados que correspondam a imunomodulação neural.

Arboleda et al. (2011) e Villanova Jr (2013) observaram recuperação sensitiva e parcial da motricidade em ratos com lesão medular induzida e que foram submetidos ao transplante de CTDA sete dias após lesão, constaram maior

presença de neurópilos no parênquima medular, o que configura ação parácrina no local da lesão.

De acordo com Monteiro et al. (2009), a ação parácrina é decorrente da plasticidade das CTDA, já que estas podem originar tecidos mesodermis e não mesodermis. Além disso, possuem características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam as possibilidades de utilização terapêutica. As CTDA secretam uma grande variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento e, por meio dessas moléculas bioativas, proporcionam a modulação da resposta inflamatória, o restabelecimento do suprimento vascular e a reparação adequada do tecido, contribuindo para a homeostasia tissular e imunológica sob condições fisiológicas. Também podem induzir as demais células presentes no nicho tecidual a secretarem outros fatores solúveis que estimulam a diferenciação dessas células indiferenciadas, favorecendo o processo de reparação. Propriedades estas que não foram observadas neste estudo, por sua metodologia, e por ter sido objeto de estudo cães com lesão medular crônica, esperava-se que os transplantes pudessem estimular as células-tronco viáveis próximas a lesão, se houve, não foi suficiente para obtenção de significância clínica.

Lesões crônicas possuem cicatriz glial, e ela é composta por matriz extracelular e nela há um grande número de moléculas que inibem o crescimento axonal; proteoglicanos como sulfato de condroitina são as principais moléculas inibidoras sintetizados por astrócitos reativos. Outras moléculas inibidoras presentes na cicatriz glial incluem proteínas associadas à mielina, tais como a glicoproteína associada à mielina, Nogo-A, e glicoproteínas oligodendríticas da mielina que são potentes inibidoras de crescimento de neuritos (WRIGHT et al., 2011). Neste estudo o tempo mínimo de lesão dos pacientes avaliados foi de três meses, e segundo Olby et al. (2003) e Fawcett et al. (2007) este intervalo de tempo é equivalente a 12 meses de lesão em pacientes humanos.

Além das análises sensitivas e de deambulação, os cães que participaram deste estudo também foram avaliados cistometricamente, e anterior as estas avaliações, foram realizadas urinálise, urocultura e antibiograma, e após sete dias

de tratamento, é possível a avaliação cistométrica (D'ANCONA (2015)). Quando há a presença de cistite bacteriana, além do uso de antibiótico apropriado deve-se ter o cuidado com a velocidade de infusão de fluido para a obtenção das pressões vesical, abdominal e detrusora, recomenda-se velocidade baixa, evitando assim possível pielonefrite (D'ANCONA, 2015). Cuidado este que foi observado durante todo o estudo, a infusão foi de 10-20 mL/min que é considerada uma velocidade baixa.

Cistometricamente não foi observada variação das pressões avaliadas (vesical, abdominal e detrusora) nos tempos estudados, presume-se que as razões sejam as mesmas da falta de recuperação sensitiva e motora. Estudos em lesões agudas comprovam a capacidade das CTDA em estimular a remielinização e a angiogênese (POLL et al., 2008; MEIRELLES et al., 2009; UCCELLI et al., 2011; QUERTAINMONT et al., 2012). Neste estudo, entretanto havia cicatriz glial, e as bexigas urinárias devido a incontinência por um longo período, provavelmente apresentavam maior grau de colagenização, o que conforme Maia et al. (2006) e D'Ancona (2015) é impeditivo de boa dilatação e adequada complacência.

Outros estudos ainda comprovam que as CTDA são capazes de se diferenciarem em células neuronais não somente *in vitro*, mas também *in vivo* após o transplante (GRECO et al., 2008; XU et al., 2010), o que a torna o transplante de CTM uma opção viável para a substituição de neurônios lesados. Contudo, ainda é vista como uma terapia ainda não consolidada (KAMINSKI, 2011). Neste estudo, apesar do relato de alguns proprietários que seus animais tiveram melhora clínica no tocante à procura de grama para urinar e que diminuiu o gotejamento urinário, observou-se discreta melhora da funcionalidade vesical, sem significância estatística, resultados também observados por Pal et al. (2010), Rodrigues (2011), Carvalho (2011) e Kaminski (2011) com células autólogas.

A cronicidade da lesão impediu ação das CTDA na atenuação da resposta inflamatória; diminuição da imunorreatividade dos astrócitos e maior ativação de células-tronco endógenas. Kurozumi et al., (2004), Lu et al., (2005) e Quertainmont et al., (2012), provaram que CTDA são capazes de secretar fatores de crescimento e citocinas, como o fator de crescimento neural (NGF), fator

neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias como IFN- γ e IL-10. Estas citocinas e fatores tróficos podem ter um efeito benéfico após a lesão espinhal sobre a reparação e reorganização das conexões neuronais; na indução de regeneração; no estímulo a neurogênese; no crescimento axonal; na redução da resposta inflamatória e na proteção do tecido, todavia tais mecanismos são pouco duradouros, provavelmente durem poucas semanas, e possivelmente não agem sobre cicatriz glial, o que indubitavelmente estava presente em todos os cães pertencentes a este estudo.

A redução significativa da reatividade dos astrócitos nos animais tratados com CTDA, foi observado por Araújo (2013), este autor sugere que as CTDA podem ter reduzido a resposta dos astrócitos; e por consequência, podem agir reduzindo os efeitos inibitórios do tecido cicatricial/glial proporcionando um ambiente mais permissivo para a extensão axonal. Segundo Ronaghi et al. (2010), o recrutamento de células-tronco neurais endógenas pode ser uma alternativa para o tratamento da lesão medular, por ser uma estratégia não invasiva e que evita a necessidade de imunossupressão. Araújo (2013) mostrou através de seus estudos que os grupos tratados com as CTDA apresentaram quantidade maior de células-tronco neurais no local da lesão do que nos grupos controles. Assim, o transplante de CTDA em fase aguda pode ter influenciado o ambiente de lesão para fornecer fatores de crescimento e sinalização para a proliferação de células-tronco endógenas conforme preconizado por Urdzikova et al. (2006) e Rossi et al. (2010). Wu et al. (2003) mostraram a recuperação funcional após o transplante de CTM no momento da lesão e atribuiu isso a diferenciação aumentada de células tronco neurais endógenas.

4 CONCLUSÃO GERAL

O uso de células-tronco derivadas do tecido adiposo no volume e frequência estudada não contribui positivamente para a melhora clínica de cães com lesão medular crônica.

A terapia celular é uma alternativa terapêutica promissora, porém a compreensão da biologia dessas células ainda é uma ciência em formação.

O uso de transplante de células para a lesão medular é uma área que evolui rapidamente na medicina regenerativa. Inúmeros modelos animais estão sendo usados atualmente. No entanto, a tradução para pacientes humanos ainda é um passo desafiador. Os cães são de importância crescente como um modelo de translação para a doença humana uma vez que existe uma maior consciência da necessidade de aumentar a qualidade dos dados pré-clínicos. O uso de cães em última análise, traz benefícios tanto para a medicina humana, quanto para veterinária.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. R. Avaliação histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinhal de ratos Wistar tratados com células-tronco mesenquimais. 2013. 45f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa.
- ARBOLEDA, D.; FOROSTYAK, S.; JENDELOVA, P.; MAREKOVA, D.; AMEMORI, T.; PIVONKOVA, H.; MASINOVA, K.; SYKOVA, E.; Transplantation of Predifferentiated Adipose-Derived Stromal Cells for the Treatment of Spinal Cord Injury. **Cell Mol Neurobiol**, v.31, p.1113–1122, 2011.
- BAI, X.; PINKERNELL, K.; SONG, Y. H.; NABZDYK, C.; REISER, J.; ALT, E. Genetically selected stem cells from human adipose tissue express cardiac markers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 355, n. 3, p. 665-671. 2007.
- BARREIRA, A. P. B. Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em eqüinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica. 2005. 98f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BIERNASKIE, J.; SPARLING, J. S.; LIU, J.; SHANNON, C. P.; PLEMEL, J. R.; XIE, Y.; MILLER, F. D.; TETZLAFF, W. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. **The Journal of Neuroscience**. v. 27, p. 9545-9559. 2007.
- BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; HAN, R.; HEAZLEWOOD, C.; JONES, B.; KAMBOURIS, M.; KOLLAR, K.; MCTAGGART, S.; PELEKANOS, R.; RICE, A.; ROSSETTI, T.; ATKINSON, K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v.18, n.1, p.846-858. 2007.
- CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of Pathology**. v. 217, n. 2, p. 318-324. 2009.
- CAPLAN A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 98, p. 1076-1084. 2006.
- CARVALHO, P. H. Avaliação neurológica e histológica de lesão compressiva da medula espinhal de ratos Wistar, tratados com células-tronco mesenquimais. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa.

CHAVES, R. O. ; BECKMANN, D. V. ; AIELLO, G ; MAZZANTI, A. Doenças neurológicas em cães atendidos no hospital veterinário da universidade federal de santa maria, RS:1184 CASOS (2006-2013). **Pesquisa Veterinária Brasileira (Online)**^{JCR}, v. 34, p. 996-1001, 2014.

CHOPP, M.; ZHANG, X. H.; LI, Y.; WANG, L.; CHEN, J.; LU, D.; LU, M.; ROSENBLUM, M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. **Neuroreport**. v. 11, p. 3001-3005. 2000.

CRIGLER, L.; KAZHANIE, A.; YOON, T.J.; ZAKHARI, J.; ANDERS, J.; TAYLOR, B.; VIRADOR, V. M. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. **The FASEB Journal – The Journal of the American Societies for Experimental Biology**. v. 21, n. 9, p. 2050-2063. 2007.

DAI, W.; HALE, S. L.; MARTIN, B. J.; KUANG, J. Q.; DOW, J. S.; WOLD, L. E.; KLONER, R. A. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short and long-term effects. **Circulation**. v. 112, n. 2, p. 214-223. 2005.

DAI, L. J.; LI, H. Y.; GUAN, L. X.; RITCHIE, G.; ZHOU, J. X. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. **Stem Cell Research**. v.2, n.1, p.16-25. 2009.

DE UGARTE, D. A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO Z.; ZUK, P. A.; ZHU, M.; DRAGOO, J. L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M. H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**. v. 174, n. 3, p. 101-109. 2003.

DEWEY, C. W. Surgery of the Thoracolumbar Spine. In: FOSSUM, T. W. **Small Animal Surgery**. 4.ed. Missouri: Elsevier, 2013, cap.41, p.1514 - 1528.

DJOUAD, F.; BOUFFI, C.; GHANNAM, S.; NOEL, D.; JORGENSEN, C. Mesenchymal stem cells: innovate therapeutic tools for reumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**. v.5, p. 392-399. 2009.

DOMINICI M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE D.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**. v. 8, n.4, p. 315-317. 2006.

FAWCETT, J. W.; CURT, A.; STEEVES, J. D.; COLEMAN, W. P.; TUSZYNSKI, M. H.; LAMMERTSE, D.; BARTLETT, P. F.; BLIGHT, A. R.; DIETZ, V.; DITUNNO, J.; DOBKIN, B. H.; HAVTON, L. A.; ELLAWAY, P. H.; FEHLINGS, M. G.; PRIVAT, A.; GROSSMAN, R.; GUEST, J. D.; KLEITMAN, N.; NAKAMURA, M.; GAVIRIA, M.; SHORT, D. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as

developed by the ICCP panel: spontaneous recovery after spinal cord injury and statistical power needed for therapeutic clinical trials. **Spinal Cord**. v. 45, p. 190–205. 2007.

FERRARI, G.; CUSELLA, G.; DE ANGELIS, M. C.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**. v. 279, n.5.536, p.1528-1530, 1998.

FORNER S. Envolvimento dos receptores b1 e b2 para as cininas na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular em ratos. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina.

FRACARO, L. Transplante de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano em ratos Wistar submetidos à lesão de medula espinhal: monitoramento, avaliação da imunomodulação e da expressão de marcadores neuronais. 2014. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

FRASER, J. K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n. 4, p. 150-154. 2006.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**. v. 3, n.4, p. 393-403. 1970.

GEBLER, A.; ZABEL, O.; SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in Molecular Medicine**. v. 18, n. 2, p. 128-134. 2012.

GHANNAM, S.; BOUFFI, C.; DJOUAD, F.; JORGENSEN, C.; NOEL, D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. **Stem Cell Research Therapy**. v.1, n.2, p. 1-7. 2010.

GOLDSTEIN, R. E.; WESTROPP, J. L. Urodynamic testing in the diagnosis of small animal micturition disorders. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. v.20, p.65-72. 2005.

GRECO, S. J.; ZHOU, C.; YE, J. H.; RAMESHWAR, P. A method to generate human mesenchymal stem cell-derived neurons which express and are excited by multiple neurotransmitters. **Biological Procedures Online**. v. 10, p. 90-101. 2008.

GREEN, J.; BOSCO, E. Trauma de medula espinhal. In: TELLO, L. H. – **Trauma em Cães e Gatos**. São Paulo: MedVet Livros, 2008. Cap. 14, p. 165 – 176.

GUEST, J. D.; HERRERA, L.; MARGITICH, I.; OLIVERIA, M.; MARCILLO, A.; CASAS, C. E. Xenografts of expanded primate olfactory ensheathing glia support transient behavioral recovery that is independent of serotonergic or corticospinal axonal regeneration in nude rats following spinal cord transection. **Experimental Neurology**. v. 212, n. 2, p. 261–274. 2008.

HERRERO, M. D.; GARCIA-ARRANZ, M.; GUADALAJARA, H.; DE-LA-QUINTANA, P.; GRACIA-OLMO, D. Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula Advanced Therapy Trial 1) and long-term evaluation. **Diseases of the Colon & Rectum**. v. 55, n. 7, p. 762-772. 2012.

HO, C. H.; WUERMSER, L. A.; PRIEBE, M. M.; CHIODO, A. E.; SCELZA, W. M.; KIRSHBLUM, S. C. Spinal cord injury medicine. Epidemiology and classification. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. v. 88, n. 3, Suppl 1, p. S49-54. 2007.

JIANG, W.; MA, A.; WANG, T.; HAN, K.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; ZHAO, X.; DONG, A.; DU, Y.; HUANG, X.; WANG, J.; LEI, X.; ZHENG, X. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. **Transplant International**. v. 19, n. 7, p. 570-580. 2006.

KAMINSKI, E. L. Transplante de células mononucleares da medula óssea em um modelo experimental de lesão da medula espinhal. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KIM, H.; WALCZAK, P.; MUJA, N.; CAMPANELLI, J. T.; BULTE, J. W. M. ICV-Transplanted human glial precursor cells are short-lived yet exert immunomodulatory effects in mice with EAE. **Glia**. v. 60, n. 7, p. 117-1129. 2012.

KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J. D.; BREHM, W.; MAINILVARLET, P.; GROGAN, S. P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**. v.24, n.4, p.1613–1619. 2006.

KOLOSSOV, E.; LU, Z.; DROBINSKAYA, I.; GASSANOV, N.; DUAN, Y.; SAUER, H.; MANZKE, O.; BLOCH, W.; BOHLEN, H.; HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B. K. Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. **The FASEB Journal – The Journal of the American Societies for Experimental Biology**. v. 19, n. 6, p. 577-579. 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. Tissue renewal and repair: regeneration, realing and fibrosis. In: KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran. Pathologic basis of disease**. 7ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. Cap.3, p 91-94.

KUROZUMI, K.; NAKAMURA, K.; TAMIYA, T.; KAWANO, Y.; KOBUNE, M.; HIRAI, S.; UCHIDA, H.; SASAKI, K.; ITO, Y.; KATO, K.; HONMOU, O.; HOUKIN, K.; DATE, I.; HAMADA H. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. **Molecular Therapy**. v. 9, n. 5, p. 189-197. 2004.

LEE, R. H.; KIM, B. C.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H. S.; SUH, K. T.; BAE, Y. C.; JUNG, J. S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cellular Physiology Biochemistry**. v. 14, n.4-6, p.311-324. 2004.

LIANZA, S.; CASALIS, M. E.; GREVE, J. M. D.; EICHBERG, R. A lesão medular. In: **Medicina de Reabilitação**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2001. p. 299-322.

LORENZ, M. D.; KORNEGAY, J. N. **Handbook of Veterinary Neurology** - Fourth Edition. Missouri: Saunders. 2011, p. 75-90.

LU, P.; JONES, L. L.; TUSZYNSKI, M. H. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal Cord injury. **Experimental Neurobiology**. v. 191, n. 2, p.344-360. 2005.

MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; MITCHELL, J. B.; FLOYDE, Z. E.; HAMMILL, L.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; TING, J. P.; STORMS, R. W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J. M. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. **Stem Cells – Tissue Specific Stem Cells**. v.24, n.6, p.1246-1253. 2006.

MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. v.119, p. 2204-2213. 2006.

MEIRELLES, L. S.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T.; CAPLAN, A. L. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 20. P. 419-427. 2009.

MENDES D. S.; ARIAS M. V. B. **Pesq. Vet. Bras**. v. 32, n.12, p.1304-13012. 2012

MEZEY, E.; CHANDROSS, K. J.; HARTA, G.; MAKI, R. A.; MCKERCHER, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**. v. 290, n. 5497, p. 1779-1782. 2000.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.;ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**. v.30, n.3, p.681-687. 2006.

MINGUELL, J. J.; CONGET, P. ERICES, A. Biology and Clinical Utilization of Mesenchymal Progenitor Cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, n. 8, p. 881-887. 2000.

MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; CARLO, R. J. D.; Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online ISSN 0103-8478

NEUHUBER, B.; ALISSA L. ; RSHI NGER, COURTNEY P.; JED S. S.; TA K A H. M.I.; ITZHAK F.; Stem cell delivery by lumbar puncture as a therapeutic alternative to direct injection into injured spinal cord. **J. Neurosurg Spine** , v. 9, p.390–399, 2008

NIE, X.; ZHANG, Y. J.; TIAN, W. D.; JIANG, M.; DONG, R.; CHEN, J. W.; JIN, Y. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue–engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**. v.36, n.1, p. 32–38. 2007.

NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**. v.69, p.928–937. 2008.

NÖTH, U.; OSYCZKA, A. M.; TULI, R.; HICKOK, N. J.; DANIELSON, K. G.; TUAN, R. S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 20, n. 5, p. 1060-1069. 2002.

OGAWA D.; OKADA, Y.; NAKAMURA, M.; KANEMURA, Y.; OKANO, H. J.; MATSUZAKO, Y.; SHIMAZAKI, T.; ITO, M.; IKEDA, E.; TAMIYA, T.; NAGAO, S.; OKANO, H. Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: Properties and tumorigenicity after long term in vitro maintenance. **Journal of Neuroscience Research**. v 87, n.2, p. 307-317. 2009.

OLBY, N.; LEVINE, J.; HARRIS, T.; MUNANA, K.; SKEEN, T.; SHARP, N. Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996–2001). **Jounal American Veterinary Medical Association**. v. 222, p. 762-769. 2003.

OSAKA, M.; HONMOU, O.; MURAKAMI, T.; NONAKA, T.; HOUKIN, K.; HAMADA, H.; KOCSIS, J. D. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. **Brain Research**. v. 1343, p. 226–235. 2010.

OSAKO, F. S. U.; AKAMINE, C.; SANTOS, M. M. Emergências Neurológicas. In: SANTOS, M. M. e FRAGATA, F. S. **Emergências e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 23, p. 317 – 329.

PAL, R.; GOPINATH, C.; RAO, N.; BANERJEE, P.; KRISHNAMOORTHY, V.; VENKATARAMANA, N. K.; TOTEY, S. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. **Cytotherapy**. v. 12, n. 6, p. 792-806. 2010

PARK, W. B.; KIM, S. Y.; LEE, S. H.; KIM, H.; PARK, J.; HYUN, J. K. The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats. **BioMed Central Neuroscience**. v. 11, p. 119-130. 2010.

PARK, E. H.; WHITE, G. A.; TIEBER, L.M. Mechanisms of injury and emergency care of acute spinal cord injury in dogs and cats. **Journal Veterinary Emergency and Critical Care**. v. 22, n. 2, p. 160-178. 2012.

PAULA, S; PEDROSO, M. F.; DALBEM, A.; COSTA, Z. S. M.; VITOLA, A.; BAES, C. V. W.; SILVA, J. L. B.; FRIEDRICH, M. A. G.; COSTA, J. C. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 263-269. 2005.

PEARSE, D. D.; SANCHEZ, A. R.; PEREIRA, F. C.; ANDRADE, C. M.; PUZIS, R.; PRESSMAN, Y.; GOLDEN, K.; KITAY, B. M.; BLITS, B.; WOOD, P. M.; BUNGE, M. B. Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. **Glia**. v. 55, p. 976–1000. 2007.

PELLEGRINO F.C.; PACHECO E.L. ; VAZZOLER M.L. Caracterización de los trastornos neurológicos en los perros: 1652 casos (marzo 2008-junio 2010). Parte I. **Argent. Neurol. Vet**. v.2, n.1, p. 78-96, 2010.

PENHA, E. M.; MEIRA, C.S.; GUIMARÃES, E.T.; MENDONÇA, M.V.; GRAVELY, F.A. Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. **Stem Cells**, v. 2014: ID. 437521.

PEREIRA L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 13, p. 7-14. 2008.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**. v. 95, n. 1, p. 9-20. 2004.

POLL, D.; PAREKKADAN, B.; BOREL, R. I. H. M.; TILLES, A. W.; YARMUSH, M. L. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs. **Cellular and Molecular Bioengineering**. v. 1, p. 42–50. 2008.

PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P.; CLAVEL, C.; CORRE, J.; BOUSQUET, C.; TAUREAU, C.; COUSIN, B.; ABBAL, M.; LAHARRAGUE, P.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L.; BLANCHER, A. Immunomodulatory effect of

human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**. v.129, n.1, p.118–129. 2005.

QUERTAINMONT, R.; CANTINIEAUX, D.; BOTMAN, O.; SID, S.; SCHOENEN, J.; FRANZEN, R. Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. **Plos One**. v. 7, n. 6, p. 1-15. 2012.

RODRIGUES, L. P. O uso de células-tronco adultas humanas na recuperação funcional da lesão medular traumática em ratas Wistar. 2011.104f. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RONAGHI, M.; ERCEG, S.; MORENO-MANZANO, V.; STOJKOVIC M. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? **Stem Cells**. v. 28, p. 93-99. 2010.

ROSSI, S. L.; NISTOR, G.; WYATT, T.; YIN, H. Z.; POOLE, A. J.; WEISS, J. H.; GARDNER, M. J.; DIJKSTRA, S.; FISCHER, D. F.; KEIRSTEAD, H. S. Histological and Functional Benefit Following Transplantation of Motor Neuron Progenitors to the Injured Rat Spinal Cord. **Plos One**. v. 5, p. 1-15. 2010.

RYU, H. H.; KANG, B. J.; PARK S. S.; KIM, Y.; SUNGG. J.; WOO H. M.; KIM W. H.; KWEON, O. K.. Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fat, Bone Marrow, Wharton's Jelly, and Umbilical Cord Blood for Treating Spinal Cord Injuries in Dogs **J. Vet. Med. Sci**. v. 74, n.12, p.1617–1630, 2012.

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; VILLEROCHÉ, V. J.; ROSSI, G. A.; BROUTY-BOYÉ D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**. v. 85, n. 8, p. 962-971. 2005.

SABERI, H.; MOSHAYEDI, P.; AGHAYAN, H. R.; ARJMAND, B.; HOSSEINI, S. K.; EMAMI-RAZAVI, S. H.; RAHIMI-MOVAGHAR, V.; RAZA, M.; FIROUZI, M. Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: An interim report on safety considerations and possible outcomes. **Neuroscience Letters**. v. 443, p. 46–50. 2008.

SAHNI, V.; KESSLER, J. A. Stem cell therapies for spinal cord injury. **Nature Reviews Neurology**. n. 6, p. 363-372. 2010.

SANTOS, R. P.; MAZZANTI, A; BECKMANN, D. V.; AIELLO, G; RIPPLINGER, A. Recuperação funcional em cães paraplégicos com doença do disco intervertebral sem percepção à dor profunda submetidos ao tratamento cirúrgico: 15 casos (2006-2010) . **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 243-246, 2012.

SELMANI, Z.; NAJI, A.; ZIDI, I.; FAVIER, B.; GAIFFE, E.; OBERT, L.; BORG, C.; SAAS, P.; TIBERGHEN, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D.; DESCHASEAUX, F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. **Stem Cells**. v. 26, n. 1, p. 212-22. 2008.

SHI, S.; BARTOLD, P. M.; MIURA, M.; SEO, B. M.; ROBEY, P. G.; GRONTHOS, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthodontics & Craniofacial Research**. v. 8, n. 3, p. 191-199. 2005.

SILVA, A. J.; VILLANOVA JR. J. A.; QUITZAN, J. G.; FRACARO, L.; REBELATTO, C. L. K.; BARCHIKI, F.; DOMINGUEZ, A. C.; BROFMAN, P. R. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; MOURA, S. A. B. Effect of mesenchymal stem cells on movement and urination of rats with spinal cord injury. Semina. **Ciências Agrárias (Online)**, v. 35, p. 3205-3214, 2014.

SOUZA, A. S.; ESCOBAR, F. B.; DEL BEL, E. A. Influência do estreitamento do canal vertebral e do tempo para a descompressão na recuperação locomotora de ratos. **Coluna/Columna**. v. 8, n.2, p.117-126. 2009.

STRUTT, B.; KHALIL, W.; KILLINGER, D.; Growth and differentiation of human adipose stromal cells in culture. In: **Methods in Molecular Medicine: Human Cell Culture Protocols**. New Jersey: Humana Press, p 41-51, 1996.

THRALL, Mary Anna. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015. v.1, cap.3 p. 80.

TOBIAS, C. A.; SHUMSKY, J. S.; SHIBATA, M.; TUSZYNSKI, M. H.; FISCHER, I.; TESSLER, A.; MURRAY, M. Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration. **Experimental Neurology**. v. 184, p. 97–113. 2003.

TOOMBS, J. P.; WATERS, D. J. Afecção do Disco Intervertebral. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007. v.1, cap.80, p.1193 - 1209.

TSUJI, O.; TAKAHASHI, Y.; KUMAGAI, G.; HARA, C. M.; OKANO, H. J.; MIYAWAKI, A.; TOYAMA, Y.; OKANO, H.; NAKAMURA, M. Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. **Cell Transplantation**. v. 20, p.727-739. 2011.

UCCELLI A, BENVENUTO F, LARONI A, GIUNTI D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. v. 24, p. 59–64. 2011.

URDZIKOVA, L.; JENDELOVA, P.; GLOGAROVA, K.; BURIAN, M.; HAJEK, M.; SYKOVA, E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. **Journal of Neurotrauma**. v.23, n. 9, p. 1379-1391. 2006.

VILLANOVA JUNIOR, J. A. Transplante de célulastronco derivadas do tecido adiposo em ratos submetidos à lesão medular compressiva, com e sem tratamento com corticoide. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

WONG, T.; GAMMON, L.; LIU, L.; MELLERIO, J. E.; DOPPING-HEPENSTAL, P. J. C.; PACY, J.; ELIA, G.; JEFFERY, R.; LEIGH, I. M.; NAVSARIA, H.; MCGRATH, J. A. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 128, p. 2179–2189. 2008.

WRIGHT, K. T.; MASRI, W. E.; OSMAN, A.; CHOWDHURY, J.; JOHNSON, W. E. B. Concise Review: Bone Marrow for the Treatment of Spinal Cord Injury: Mechanisms and Clinical Applications. **Stem Cells**. v. 29, n. 2. p. 169-178, 2011

WU, S.; SUZUKI, Y.; EJIRI, Y.; NODA, T.; BAI, H.; KITADA, M.; KATAOKA, K.; OHTA, M.; CHOU, H.; IDE, C. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. **Journal of Neuroscience Research**, v. 72, p. 343–351. 2003.

XU H.; MIKI, K.; ISHIBASHI, S.; INOUE, J.; SUN, L.; ENDO, S.; SEKIYA, I.; MUNETA, T.; INAZAWA, J.; DEZAWA, M.; MIZUSAWA, H. Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion. **Journal of Neuroscience Research**. v. 88, p. 3598–3609. 2010.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, 23 p.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, H. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**. v.13, n.2, p.4279-4295. 2002.