



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA PUCPR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

VINICIUS PONTES DO NASCIMENTO

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CORTICOTERAPIA SOBRE A TERAPIA CELULAR  
EM RATOS SUBMETIDOS A LESÃO MEDULAR – AVALIAÇÃO MOTORA

CURITIBA

2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
VINICIUS PONTES DO NASCIMENTO

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CORTICOTERAPIA SOBRE A TERAPIA CELULAR  
EM RATOS SUBMETIDOS A LESÃO MEDULAR – AVALIAÇÃO MOTORA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Roberto Vialle

**Coordenador:** Prof. Dr. Luis Carlos von Bahten

CURITIBA

2012

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

Nascimento, Vinicius Pontes do  
N244a Avaliação motora e estudo da influência da corticoterapia sobre a terapia  
2012 celular em ratos submetidos a lesão medular / Vinicius Pontes do Nascimento ;  
orientador, Luiz Roberto Vialle; coordenador, Luiz Carlos Von Bahten. – 2012.  
viii, 45 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2012  
Bibliografia: f. 38-44

1. Medula espinhal - Ferimentos e lesões. 2. Terapia celular. 3. Células-  
tronco mesenquimais. 4. Tecido adiposo. 5. Cirurgia. I. Vialle, Luiz Roberto.  
II. Bahten, Luiz Carlos Von. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617



**ATA DA SESSÃO DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA AO NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

**ATA DE DISSERTAÇÃO Nº 112**

Aos dezessete dias do mês de setembro de 2012, realizou-se a sessão de defesa de dissertação "AVALIAÇÃO MOTORA E ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CORTICOTERAPIA SOBRE A TERAPIA CELULAR EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR" Área de Concentração: Lesão Celular, Reparação e Cicatrização, apresentada por Vinícius Pontes do Nascimento sob orientação do Prof. Dr. Luiz Roberto Gomes Vialle.

Requisito para obtenção do título de mestre.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes professores:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten	
Prof. Dr. Sergio Luiz Rocha	
Prof. Dr. Gabriel Skroch	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten      Avaliação: APROVADO  
 Prof. Dr. Sergio Luiz Rocha      Avaliação: APROVADO  
 Prof. Dr. Gabriel Skroch      Avaliação: APROVADO  
 Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

---



---



---

**Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten**  
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

***Dedico este trabalho:***

*A minha doce esposa Priscila por me acompanhar durante os últimos 7 anos de estudo, por garantir minha estabilidade e manter nossa família sempre unida. Dedico a minha filha Sofia*

*e ao meu filho, recém nascido, Vitor para que sirva de exemplo e manter sempre acesa a vontade de fazer melhor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos orientadores Prof. Dr. Roberto Vialle e Prof. Emiliano Vialle pela oportunidade e confiança dadas a mim e pelo empenho em aceitar e ajudar-me a transpor as dificuldades.

Ao residente Francisco Zaniolo pelos cuidados com os animais e inúmeras participações durante todo o processo da pesquisa.

A todos do Laboratório de Engenharia e Transplante Celular da PUCPR na pessoa do Prof. Dr. Paulo Brofman pelo trabalho perfeito em coletar, isolar e multiplicar as células tronco com tamanha destreza e empenho.

Ao Prof. Dr. Jamil Faissal Soni pela contribuição científica, apoio durante todo o processo e pela amizade sem limites da sua família, que durante estes anos tornou-se parte da minha.

Aos professores da pós graduação por dispensar tanto tempo de suas vidas para ministrar as aulas e por abrir meus horizontes vislumbrando a vida acadêmica.

Ao tio e estatístico Prof. Dr. Luiz Evaldo de Moura Pádua por sempre ter palavras de incentivo e confiança e pela disposição e ajuda gratuitas durante a elaboração desta dissertação.

Ao Sr. Misael, funcionário da PUCPR, por ter nos ajudado de forma incondicional em todo o transcorrer do trabalho.

A Deus por dar saúde a mim e a minha família, permitindo concluir esta etapa.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Sistema NYU impactor. Laboratório de lesões medulares da PUCPR.....	19
<b>Figura 2</b> – Lesão medular pelo sistema NYU impactor. Laboratório de lesões medulares da PUC-PR.....	20
<b>Figura 3</b> – Cultivo das CTM a partir de células adiposas humanas. Laboratório de Engenharia e Transplante Celular da PUC-PR.....	21
<b>Figura 4</b> – Avaliação motora segundo o <i>Protocolo de Kuhn e Wrathall</i> . Avaliação no 15º dia após a lesão medular utilizando-se o <i>teste de Kruskal-Wallis</i> .....	26
<b>Figura 5</b> – Avaliação motora segundo o <i>Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall</i> . Avaliação no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o <i>teste de Kruskal-Wallis</i> .....	27
<b>Figura 6</b> – Avaliação motora segundo o <i>Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall</i> . Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o <i>test t de Student</i> (GRUPO CONTROLE).....	29
<b>Figura 7:</b> Avaliação motora segundo o <i>Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall</i> . Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o <i>test t de Student</i> (GRUPO 1).....	31
<b>Figura 8:</b> Avaliação motora segundo o <i>Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall</i> . Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o <i>test t de Student</i> (GRUPO 2).....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ASCs:** *Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells*

**ASIA:** American Spinal Injury Association

**BBB:** Escala funcional Basso, Beatie and Bresnahan

**BM-derivada:** *Bone Medullar* – derivada

**CEUA:** Comitê de Ética no Uso de Animais

**COBEA:** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**CTM:** Células Tronco Mesenquimais

**DMEM:** meio DULBECCO MEM

**FCF:** Fator de Crescimento Fibroblástico

**GM-1:** Monosialotetraesossilglangliosídeo

**LM:** Lesão medular

**MP:** Metilprednisolona

**MSC:** Célu

**MASCIS:** *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*

**NASCIS:** *North American Spinal Cord Injury Study*

**NYUI:** *New York University Impactor*

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**TRM:** Trauma raquimedular



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação no 15º dia após a lesão medular utilizando-se o teste de *Kruskal-Wallis*.....25

**Tabela 2:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o teste de *Kruskal-Wallis*.....27

**Tabela 3:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o teste *t de Student*.....28

**Tabela 4:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o teste *t de Student*.....30

**Tabela 5:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o teste *t de Student*.....31

## RESUMO

**Introdução:** O trauma constitui uma relevante causa de mortalidade no Brasil e no mundo, atingindo a parcela jovem da população, economicamente ativa, levando muitas vezes a sequelas incapacitantes. O trauma representa a terceira maior causa de morte no mundo, com índices menores apenas que as neoplasias e doenças cardiovasculares. O evento traumático não se completa somente no acidente, mas também pode ser interpretado como situação patológica de etiologia variada, multissistêmica e de caráter endêmico na sociedade moderna. Desenvolvemos trabalho experimental avaliando o efeito da metilprednisolona na função motora após lesão medular completa e terapia celular com células tronco mesenquimais originadas de tecido adiposo humano, em *Rattus Norvegicus*. **Métodos:** Foram utilizados 30 ratos *Wistar*, fêmeas e adultos jovens, divididos em 3 grupos. Grupo controle, grupo 1 que recebeu terapia celular após lesão medular e grupo 2 que recebeu terapia celular e corticoterapia. Todos os ratos foram submetidos à laminectomia e a contusão medular pelo sistema NYU *impactor*. Os animais foram avaliados no 15º e 30º dia, sendo controladas as pontuações motoras segundo Kuhn e Wrathall. Foi realizada terapia celular utilizando-se células tronco derivadas de tecido adiposo humano. **Resultados:** As avaliações motoras, após a aplicação dos testes estatísticos, apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos estudo e o grupo controle ( $p < 0,05$ ) em alguns parâmetros funcionais. Quando avaliada a função motora entre o grupo I e o grupo II a corticoterapia não trouxe melhora. **Conclusão:** A corticoterapia com metilprednisolona em bolus não agregou melhora na função motora em ratos após lesão medular completa e tratados com células tronco derivadas de adipócitos.

**DESCRITORES:** Lesão medular, Terapia celular, Células tronco mesenquimais, Tecido Adiposo

## ABSTRACT

**Introduction:** Experimental work evaluating motor function after full medullar damage and stem cell therapy with mesenchymal cells from human adipose material in *Rattus norvegicus*. **Method:** 30 female young-adult Wistar rats were used, divided into 3 groups: Control Group, Group 1 which received stem cell therapy after medullar damage, and Group 2 which received stem cell therapy and steroid therapy. All rats were submitted to laminectomy and medullar contusion via NYU *impactor* system. The animals were evaluated on the 15<sup>o</sup> and 30<sup>o</sup> day, having under control the motor score according to Kuhn and Wrathall. Stem cell therapy was carried out using stem cells derived from adipose human material. **Results:** Motor evaluation, after statistical treatment, presented statistically significant differences between groups ( $p < 0.05$ ) with respect to some functional parameters. **Conclusion:** No functional improvements were found in the motor study with animals submitted to medullar damage and treated with stem cell therapy associated or not to steroid therapy.

**DESCRIPTORS:** Medullar Damage, Stem Cell Therapy, Mesenchymal Stem Cells, Adipose Material.

**KEY WORDS:** Spinal cord injury, cell therapy, mesenchymal stem cells, Adipose Tissue

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVO.....	4
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
2.1 LESÃO MEDULAR EXPERIMENTAL.....	5
2.2 HISTOPATOLOGIA.....	6
2.3 TERAPIA MEDICAMENTOSA.....	7
2.3.1CORTICOTERAPIA.....	7
2.4 ESTUDOS CLÍNICOS.....	10
2.5 ESTUDO EXPERIMENTAL.....	11
2.6 TERAPIA CELULAR.....	12
<b>3 MÉTODOS</b> .....	16
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	16
3.2 INDUÇÃO DO TRAUMA MEDULAR.....	17
3.3 CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSE HUMANO, CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DAS CTM POR DIFERENCIAÇÃO FUNCIONAL <i>IN VITRO</i> , E IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	19
3.4 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA LESÃO MEDULAR DOS RATOS.....	20
3.5 MEDICAÇÕES APÓS CONTUSÃO MEDULAR.....	20
3.6 MANEJO PÓS-OPERATÓRIO.....	21
3.7 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DOS RATOS .....	21
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
<b>4 RESULTADOS</b> .....	23
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	36

ANEXOS.....	46
-------------	----

## 1 INTRODUÇÃO

Os traumatismos da medula espinhal podem provocar uma mudança temporária ou definitiva nas funções motoras, sensitivas ou autonômicas. As terminologias para classificação das lesões medulares completas são a tetraplegia, quando acomete a região cervical com perda funcional nos quatro membros e a paraplegia, com acometimento da medula torácica, lombar ou sacral levando a perda funcional nos membros inferiores.<sup>1</sup> Aproximadamente metade dos pacientes que sofrem trauma raquimedular apresenta lesão medular completa sem nenhuma preservação da função sensitiva ou motora abaixo do nível de lesão.<sup>2</sup>

Nos últimos anos observa-se um aumento de sua incidência, decorrente na maioria das vezes de acidentes automobilísticos, acidentes de trabalho, quedas, atividades esportivas e traumas penetrantes. A incidência anual é de 15 a 40 casos por milhão de habitantes nos países desenvolvidos, acometendo principalmente jovens do sexo masculino com média de idade de 38 anos.<sup>3,4,5</sup> Nos Estados Unidos da América a tetraplegia ocorre em 54% dos pacientes, e a paraplegia os 46% restantes. O trauma raquimedular localiza-se 55% na região cervical, 15% na coluna torácica, 15% na região tóraco-lombar e 15% na região lombo-sacra.<sup>6</sup> O sofrimento psíquico, a necessidade de readaptação social, o aumento do gasto energético e as morbidades envolvidas após a injúria medular têm despertado grande interesse e promovido o desenvolvimento de pesquisas.<sup>7</sup>

A lesão medular pode decorrer de três anormalidades seguidas do dano tecidual: destruição por trauma direto; compressão por fragmentos ósseos, hematoma ou disco; e isquemia por dano ou impacto nas artérias vertebrais. A destruição tecidual da medula ocorre em dois momentos: primário ou mecânico, decorrente da lesão traumática mecânica aguda que lesa e comprime os elementos neurais e independe de mecanismos celulares, e secundário ou isquêmico em função de lesões adicionais, conseqüente a uma cascata de eventos que envolvem edema, alteração da perfusão e do fluxo sanguíneo, fatores de crescimento, influxo celular de cálcio, peroxidação lipídica e, por fim, necrose tecidual, que são eventos biológicos desencadeados pelo trauma inicial.<sup>8</sup>

A observação de que mecanismos fisiopatológicos e biológicos agem na destruição tecidual secundária após traumatismos raquimedulares foi descrita pela

primeira vez por Allen <sup>9</sup> em 1911, mas somente foi retomada e aprofundado o estudo dessa ação bioquímica por volta de cinqüenta anos depois.

Acredita-se que a MP administrada em altas doses, iniciada em menos de 8 horas após o trauma, melhora a função de alguns grupos musculares.<sup>6</sup> Acredita-se que os mecanismos de ação da MP sejam: a inibição da peroxidação lipídica, a diminuição da degeneração do axônio, a prevenção de isquemia e a reversão do acúmulo de cálcio intracelular.<sup>13,27</sup> Apesar das inúmeras pesquisas envolvendo a MP, os resultados apresentam-se muito variáveis, necessitando mais estudos para a determinação da dose e dos seus efeitos.<sup>6</sup>

Diante do conhecimento da fisiopatologia da lesão medular, em que o processo inflamatório pode levar a lesões secundárias graves, o tratamento nesta fase passa a ter importante papel. A interrupção da fase inflamatória e a utilização de terapia celular como tratamento adjuvante mostra-se possível de aperfeiçoar a integração de células pluripotentes na reparação da lesão, antes das degenerações parenquimatosa e neuronal.<sup>3,13</sup>

Uma terapia em potencial para melhorar o tecido cicatricial é dispor células mesenquimais no local da lesão.

As pesquisas em terapia celular trouxeram o conceito de que célula-tronco é aquela “com capacidade de auto-renovação ilimitada/prolongada, capaz de produzir, pelo menos, um tipo de célula altamente diferenciada”, ou seja, a que “tem a capacidade de se dividir em células idênticas a ela ou em diferentes tipos de células”.<sup>28</sup> Existem duas fontes possíveis de células tronco, distinguindo-se quanto a origem e ao potencial de diferenciação: células embrionárias e células adultas. As primeiras são extraídas do embrião no terceiro dia de desenvolvimento constituindo células tronco totipotentes, ou podem ser extraídas de blastocistos no quinto dia e desenvolvimento com potencial e gerar qualquer tipo de tecido, sendo denominadas pluripotentes. As células tronco adultas, retiradas de tecidos especializados, teriam potencial multipotente, podendo gerar tipos celulares especializados encontrados no tecido do qual se originam.

A descoberta da capacidade pluripotente das células adultas provocou um grande otimismo nas pesquisas com terapia celular. Atualmente, diversas fontes têm sido utilizadas para extração de células tronco: cordão umbilical; tecido adiposo;<sup>30</sup> tecido nervoso e polpa de dentes de leite.

A terapia celular utilizando células tronco mesenquimais (CTM) tem sido uma das fontes mais utilizadas. As CTM que podem ser extraídas da medula óssea, tecido adiposo, derme, músculos e do sangue periférico; têm potencial de diferenciação em diferentes linhagens incluindo possíveis formadoras de tecidos musculares, ósseo, cartilaginoso, adiposo e neurológico. Esta capacidade de diferenciação torna as CTM excelentes candidatas a células tronco para a produção tecidual.

O questionamento da capacidade pluripotencial das células tronco mesenquimais tem provocado discussões e levado a estudos clínicos e farmacológicos principalmente na busca de tratamento de doenças degenerativas.

Estudos utilizando células mesenquimais do tecido adiposo humano mostram que há uma capacidade proliferativa e de diferenciação adequada destas células e que elas têm um potencial de proliferação superior ao das células extraídas da medula óssea.<sup>31, 32</sup>

O tecido adiposo, assim como a medular óssea, tem origem do mesênquima e possui estroma estruturado facilmente isolado. Tem estrutura complexa e consiste em adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células do músculo liso vascular, células endoteliais, monócitos, macrófagos e linfócitos. Baseado nisto o tecido adiposo representa uma fonte de células tronco com efeito em diversos campos de pesquisa.

Pelas características do tecido adiposo de estar disponível em grandes quantidades (100 ml até 1l) por meio da lipossucção e com mínima morbidade, como a frequência de células tronco obtidas no tecido adiposo ter sido maior que nos aspirados medulares e a capacidade de proliferação destas células maior que as obtidas de células mesenquimais medulares têm definido as células de gordura como mais promissora na obtenção das células tronco pluripotentes para a aplicação terapêutica.

O uso de células-tronco somáticas, principalmente, pela praticidade e por não envolver questões éticas e imunogênicas, é uma das áreas mais promissoras nas pesquisas acerca da regeneração tecidual.



## 1.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da corticoterapia em bolo sobre a recuperação motora de ratos submetidos a lesão medular experimental e tratados com terapia celular.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LESAO MEDULAR EXPERIMENTAL

Allen desenvolveu um modelo experimental para produzir lesão medular. Utilizou cães com lesão medular causada por queda de peso sobre a medula, mantendo a dura-máter íntegra. Qualificou a gravidade da lesão como o produto em gramas pela altura em centímetros, sendo o resultado expresso em g/cm. Padronizou e enfatizou a reprodutibilidade do método.<sup>9</sup>

Gruner, na década de 90, desenvolveu o *New York University Impactor* (NYUI), aparelho para provocar lesões medulares padronizadas e reprodutíveis seguindo o método de Allen. Foi associado ao método de lesão medular um software para avaliar as variáveis envolvidas no momento da lesão.<sup>34</sup> Vialle salientou que este aparelho é uma alternativa melhor aos modelos anteriormente descritos, pois permite obter medidas da velocidade de impacto e da quantidade de contusão medular, produzindo lesão controlada e reprodutível.<sup>35</sup>

Estudos para avaliação da capacidade de reprodução seriada da lesão medular foram realizados em laboratório seguindo a linha de pesquisa desenvolvida por Vialle.  
35, 36

Behrmann et al<sup>37</sup> apresentaram um novo método para produzir lesão medular em ratos através de deslocamento breve da superfície dural com vários graus de deslocamento até a secção completa. Realizaram análise histomorfométrica e da função locomotora pela modificação da escala de Tarlov, observando a marcha dos animais em campo aberto, em plano inclinado e em grade. Demonstraram haver recuperação funcional nos animais que sofreram contusão medular com lesão parcial quando comparados com os do grupo que foi submetido à secção. Evidenciaram que a área de lesão e a área de substância branca residual íntegra são os melhores indicadores morfológicos da recuperação funcional, tendo relação direta com a intensidade do trauma.

Rodrigues<sup>47</sup> utiliza o modelo de lesão de medula espinhal em ratos Wistar utilizando o sistema NYU, de acordo com parâmetros determinados pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* – MASCIS. Determinou a correlação estatisticamente

significante entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. Concluiu que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas e reprodutíveis.

## 2.2 HISTOPATOLOGIA

Tator e Fehlings<sup>2</sup> apresentaram evidências de que a lesão secundária é causada pelo mecanismo chave de isquemia pós-traumática e infarto, através de diferentes métodos angiográficos para avaliar a microcirculação e para medir o fluxo sanguíneo medular. Descreveram as alterações histológicas na medula lesada incluindo hemorragia, edema, necrose axonal e neuronal, desmielinização, formação cística e o infarto. Discutiram os vários métodos de tratamento sobre os efeitos vasculares da lesão medular aguda como os bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas opióides e os esteróides. Relataram que a isquemia pós-traumática é um mecanismo secundário importante da lesão medular e que pode ser contido com o uso de corticóides.

Delamarter et al<sup>39</sup> realizaram estudo de lesão medular em modelo animal avaliando a duração da compressão e o tempo de descompressão e a relação com a recuperação funcional. Avaliaram os resultados do potencial evocado somato-sensitivo, exame neurológico e estudo histopatológico. Determinaram relação direta do tempo de compressão com os achados histológicos, neurofisiológicos e com a recuperação da função locomotora.

Ildan<sup>40</sup> realizou análise bioquímica em medulas animais lesadas e submetidas a corticoterapia mostrando menor taxa de oxidação e menor taxa de inativação da bomba de sódio-potássio-ATPase.

Topsakal<sup>41</sup> em seu estudo provocando isquemia transitória com uso de cliques de aneurisma submeteu os animais a corticoterapia com MP e avaliou a ação do medicamento sobre o metabolismo dos lipídios de membrana, encontrando menor alteração no grupo que recebeu MP.

## 2.3 TERAPIA MEDICAMENTOSA

Hall e Braughler<sup>42</sup> e Hall, Wolf e Braughler<sup>43</sup> mostraram que o pré tratamento com uma dose única de succinato sódico de MP protegeu, da peroxidação lipídica, frações da medula espinhal não lesada removidas uma hora após a administração do esteróide. Foi demonstrado nestes estudos que doses inferiores a 30 mg/kg de peso foram ineficazes e que doses de 90 mg/kg promoveram peroxidação lipídica.

Gebrin et al (1997a)<sup>43</sup> revisaram os avanços clínicos e científicos existentes sobre a manipulação farmacológica no tratamento em pacientes com déficit neurológico causado por lesão medular. Descreveram as principais substâncias endógenas que participam do dano medular secundário e as drogas em estudo para combater este efeito. Indicaram a MP como a primeira droga a demonstrar melhora funcional comprovada e citam as pesquisas promissoras com aminoesteróides e outras drogas como o tilirazade e o GM-1. Por fim, ressaltaram a grande importância e contribuição dos estudos multicêntricos NASCIS 1, 2 e 3, desenvolvidos na América do Norte.

Afirmaram, também, que a avaliação da função locomotora após lesão medular experimental é importante para avaliar a eficácia do tratamento conservador com uso de drogas. Nesta linha de pesquisa foram avaliadas a recuperação dos animais tratados com MP, e um aminoesteróide, afirmando que todos possuem ação positiva sobre a recuperação motora após a lesão medular em modelo animal e sem efeito sinérgico quando combinadas.

### 2.3.1 CORTICOTERAPIA

Hall<sup>44</sup> avaliou a ação de glicocorticoides esteroidais no tratamento clínico do trauma raquimedular, mostrando evidências de redução do edema medular, porém com capacidade de recuperação motora decepcionante.

Bracken, Collins e Freeman<sup>45</sup> compararam a eficácia de MP em baixas doses (100 mg endovenoso durante 10 dias) e altas doses (1000 mg endovenoso durante 10 dias) sobre o prognóstico após trauma raquimedular. Não houve diferença

estatística entre os grupos após seis meses e um ano de tratamento, sendo que apresentou risco elevado para infecções nos pacientes que receberam altas doses.

Anderson e Stokes<sup>46</sup> demonstraram que a MP pode exercer diversas ações sobre a lesão na medula espinhal, contribuindo para manutenção do metabolismo aeróbico, promovendo a redução da degeneração neuronal pós-traumática.

O *North American Spinal Cord Injury Study* (NASCIS 1) foi iniciado em 1984 com uso de MP em humanos vítimas de TRM agudo. Neste primeiro estudo multicêntrico foram divididos dois grupos randomizados: 100 mg de MP na fase inicial em bolus e 25 mg de MP a cada seis horas, durante 10 dias; e outro grupo recebendo 1000 mg de MP em bolus, seguidos de 20 mg a cada seis horas durante 10 dias. Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa quanto a infecção no grupo que recebeu altas doses de corticóide, contudo não houve diferença quanto a avaliação neurológica entre os grupos.

A partir destes resultados insatisfatórios, o programa NASCIS continuou sendo desenvolvido no intuito de padronizar as doses do corticoide a serem administradas. Em 1993 o NASCIS 2 foi realizado como estudo multicêntrico, prospectivo, randomizado tipo duplo-cego. A dose de MP foi padronizada para 30mg/kg em bolus na primeira horas e seguida de 5,4 mg/kg por hora durante 23 horas. Foram comparados os resultados com outros dois grupos que receberam placebo e naloxone. Os resultados deste estudo não mostraram melhora do prognóstico neurológico em nenhum dos grupos, porém os pacientes que receberam MP nas primeiras 8 horas do trauma raquimedular apresentaram melhora neurológica (Bracken; Holford).<sup>47</sup>

A partir deste segundo estudo NASCIS, foram desenvolvidas pesquisas seguindo as dosagens determinadas e avaliado o tempo do início do tratamento. Pacientes com lesões medulares por mecanismo penetrante e TRM fechado foram avaliados quanto a melhora neurológica após corticoterapia com MP. Os resultados não evidenciaram melhora neurológica no grupo de lesão fechada e mostraram degeneração neurológica nos pacientes vítimas de lesão penetrante e submetidos a corticoterapia quando comparados com o grupo controle (Prendergast).<sup>48</sup> Segundo Poyton<sup>49</sup> o prognóstico da lesão não estava relacionado ao tempo do início do tratamento, mas o fator determinante foi definido como a gravidade da lesão.

Gebrin et al.<sup>50</sup> publicaram artigo de revisão da literatura abordando as perspectivas de recuperação do paciente com lesão medular. Relataram os resultados do NASCIS (*North American Spinal Cord Injury Study*), que apontam a MP como droga que melhora a função neurológica e citam o GM-1 como sendo uma substância eficiente na recuperação de pacientes com lesões crônicas do sistema nervoso central (SNC). Afirmaram que axônios íntegros, mesmo que poucos podem propiciar integridade de arco reflexos viscerais, como vesical, sexual e intestinal; e que 10% de axônios remanescentes podem oferecer condições de marcha para o paciente.

Braken, Collins, Freeman<sup>45</sup> e Kaptanoglu et al.<sup>51</sup> definiram os eventos farmacológicos relacionados aos efeitos da MP na medula espinhal lesada, sendo a primeira observação a necessidade de altas doses, e o segundo, a natureza bifásica da curva dose-resposta. A explicação para estes efeitos seria uma ação direta na membrana, onde a dose de 30 mg/kg estabilizaria esta estrutura, protegendo-a da lesão pós-traumática, enquanto que doses maiores levariam a instabilidade da membrana e exacerbariam a peroxidação lipídica. O terceiro evento foi a observação de que o nível tecidual de MP na medula espinhal cai rapidamente após o trauma, provavelmente por perda tecidual e redução progressiva do fluxo sanguíneo local, trazendo a necessidade do início precoce da medicação para obtenção de efeito terapêutico

Modelos animais com uso de clipe de aneurisma na medula foram desenvolvidos para avaliar a resposta da lesão medular seguidas por corticoterapia com MP. A associação de MP e fator de crescimento fibroblástico (FCF) promoveu angiogênese na medula lesada e os animais que receberam MP apresentaram melhora funcional e histológica com diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle e ao grupo submetido apenas ao FCF.<sup>52</sup>

Lesões provocadas por isquemia e uso de cliques de aneurisma, submetidas a terapia com MP em bolo, apresentaram diminuição na progressão das alterações proximalmente a lesão.<sup>53</sup>

## 2.4 ESTUDOS CLÍNICOS

Tator et al. realizaram estudo retrospectivo e multicêntrico em 36 centros de atendimento nos EUA, avaliando os casos submetidos a tratamento cirúrgico e o tempo em que a intervenção foi realizada em pacientes com lesão medular aguda. Os resultados mostraram que apesar do tratamento cirúrgico ser bastante utilizado, um terço dos casos foi conduzido de forma conservadora e que o momento adequado de sua utilização ainda não foi determinado.<sup>54</sup>

Realizou-se revisão bibliográfica para avaliação de diversas formas terapêuticas para lesão medular. Foram avaliados estudos clínicos e pré-clínicos em humanos. O resultado desta revisão bibliográfica evidenciou diversos estudos incluindo o uso de minociclina, cethrin®, anticorpos anti-Nogo, hipotermia sistêmica, riluzol, magnésio, células tronco derivados de embriões humanos e células tronco derivadas de progenitores oligodendrócitos. A revisão sistemática da literatura evidencia resultados promissores em diversos modelos de lesão medular, devendo porém levar anos para definir o real potencial regenerativo destas terapias.<sup>55</sup>

Deda et al. realizaram estudo em nove pacientes com lesão medular crônica completa, grau A (ASIA). Eles foram tratados com transplante autólogo de células progenitoras BM-derivada de células-tronco sem complicações graves. Três semanas após a operação todos os pacientes apresentaram melhora dos movimentos e das sensações. Todos os pacientes tinham ASIA grau B ou C, após a operação. Utilizaram células estaminais autólogas, a fim de evitar os problemas associados com a rejeição imunológica e reações enxerto-versus-hospedeiro, que são frequentemente causadas por aloenxertos. A vantagem deste tipo de terapia celular é que ele não está associado com carcinogênese, que por vezes ocorre com a terapia embriogênica de células estaminais. Todos os dados mostraram que a terapia celular autóloga é eficaz e segura para o tratamento de lesões medulares.<sup>56</sup>

Sycová et al. estudaram o transplante de medula óssea autólogo em pacientes com lesão da medula espinhal transversal com relação a segurança, janela de tempo terapêutico, a estratégia de implantação, método de administração, e melhora funcional. Relataram os dados de 20 pacientes com lesão medular completa que receberam transplantes de 10 a 467 dias após a lesão. Os exames de seguimento foram feitos na 3º, 6º e 12º meses após o implante por dois neurologistas

independentes, utilizando classificação neurológica padrão de lesão, incluindo o protocolo ASIA, a pontuação Frankel, a gravação de motor e potenciais evocados somatossensoriais e avaliação de ressonância magnética para o tamanho da lesão. Este estudo de caso mostra que a implantação de células de medula óssea autogênica parece ser segura, como não houve complicações após a implantação em 11 pacientes acompanhados por mais de 2 anos. Além disso, não foi possível confirmar que os efeitos benéficos eram devidos a terapia celular. Este estudo mostra que o transplante realizado dentro de uma janela terapêutica de 3-4 semanas após a lesão irá desempenhar um papel importante em qualquer tipo de tratamento com células estaminais em uma medula que apresentou lesão completa. Os autores sugerem que estudos envolvendo uma população maior de pacientes e diferentes tipos de células são necessários antes que novas conclusões possam ser tiradas.<sup>57</sup>

## 2.5 ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Basso et al. definiram uma escala de índice de recuperação locomotora em ratos que sofreram lesão medular produzida em laboratório e a denominaram escala de BBB (Basso, Beattie e Bresnahan).<sup>58</sup>

Takao Setoguchi et al. realizou pesquisa em modelo animal com ratos promovendo lesão medular, ao nível da coluna torácica. A lesão medular era provocada por compressão durante dois minutos, levando a lesão medular completa e irreversível com paraplegia nos membros inferiores. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos que receberam células germinativas do tecido adiposo (10 µg/ kg/dia) e solução salina isotônica. Fator de células germinativas e solução salina foram administrados por via intraperitoneal após 15 minutos e 48 horas após a lesão. Relataram que o fator de células tronco evitou a apoptose de células neuronais após a lesão medular.<sup>59</sup>

## 2.6 TERAPIA CELULAR



Obter a regeneração da lesão medular tem sido o grande objetivo das pesquisas da neurociência desde que Tello e Cajal demonstraram que os axônios do sistema nervoso central podem se regenerar. Desde 1903 diversas pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de obter a regeneração sensitiva e motora das lesões medulares.<sup>60</sup>

Diversas técnicas para implantar células no tecido nervoso tem sido utilizadas para promover a integração ao tecido da medula espinhal. Células gliais do sistema olfatório tem tido bom resultado.<sup>61</sup>

Vários tipos de células gliais têm sido testados evidenciando diferentes respostas nas lesões medulares. Os transplantes mostraram proteção a degeneração secundária e produção de células mielinizadas, contudo ineficazes na promoção e melhora da degeneração.<sup>62,63</sup>

O estudo feito por Davies et al. sugerem que um enxerto inadequado de células gliais pode produzir alodinia. Um terço ou mais dos pacientes com lesão medular tem dor intratável e continuada após a sua lesão, a qual em alguns casos nunca responderá satisfatoriamente ao tratamento.<sup>64</sup>

Nos lesados medulares, os pesquisadores temem que os tratamentos que promovem a regeneração dos axônios também possam causar surgimento de fibras da dor, fazendo com que haja piora. Ainda não há clareza porque isso pode acontecer, mas Davies et al sugerem que ativação da microglia podem estar envolvidos.<sup>65</sup>

Jin Hoon Park et al. descreveram os resultados a longo prazo de 10 pacientes que foram submetidos a transplante intramedular de CTM autólogas, a partir do osso ilíaco de cada paciente e expandido por cultura durante quatro semanas, em medulas espinhais lesionadas. Três dos 10 pacientes, com lesão medular que foram diretamente injetados com células mesenquimais autólogas, mostraram melhora na potência motora dos membros superiores e nas atividades de vida diária, bem como melhora na ressonância magnética e alterações eletrofisiológicas durante acompanhamento a longo prazo de seguimento.<sup>66</sup>

Rakhi Pal et al. em um estudo clínico piloto, investigaram a cinética de crescimento de células tronco mesenquimais originárias da medulla óssea de

pacientes com lesão medular (LM), sua segurança e melhora funcional pós-transplante. Os resultados indicaram que o protocolo é seguro e sem efeitos adversos graves após o transplante em pacientes com LM. O número de pacientes recrutados e a natureza não controlada do ensaio não permitiram a demonstração da eficácia do tratamento. No entanto, os resultados encorajam mais ensaios com doses mais elevadas e diferentes vias de administração, a fim de demonstrar a recuperação / eficácia, se houver, em pacientes com LM.<sup>67</sup>

Baer e Geiger discutiram o conhecimento atual sobre a localização de células tronco originadas de tecido adiposo, sua caracterização e heterogeneidade *in vitro*, e da falta de padronização nos métodos de isolamento e cultura. Descrevem em seu trabalho as vantagens do uso do tecido adiposo como uma fonte de células tronco facilmente disponível e com várias vantagens em comparação com outras fontes. Demonstram a facilidade de obtenção em procedimentos minimamente invasivos e a grande quantidade de células estaminais obtidas. Discutem que as técnicas mais recentes de isolamento e cultura carecem de normatização, que as células tronco originadas de adipócitos são caracterizadas por sua expressão de marcadores característicos e a sua capacidade para se diferenciarem em células de linhagens meso, ecto, e endodérmicas, por possuírem uma alta plasticidade e possibilidade de diferenciação em vários tipos celulares, incluindo adipócitos, condrócitos, osteoblastos, miócitos, hepatócitos, células neurais, e as células endoteliais e epiteliais. No entanto, estudos recentes sugerem que ASCs são uma mistura heterogênea de células contendo subpopulações de células tronco e progenitoras mais comprometidas.<sup>68</sup>

Shawn J. Chua et al. em 2009, realizaram estudo em modelo animal com ratos submetidos a lesão medular. Os animais foram submetidos a transplante de citocinas derivadas de células tronco multipotentes derivadas de cordão umbilical. As cobaias do estudo eram imunossuprimidas para receber as citocinas. Foi realizada avaliação motora semanalmente até a sexta semana pela escala de avaliação motora BBB, foi realizado estudo histológico e quantificadas as áreas de lesão. Concluem que o transplante de citocinas derivadas de células tronco embrionárias podem melhorar a função neurológica em ratos com lesão aguda, possivelmente pela liberação de fatores que reduzem a lesão secundária.<sup>69</sup>

Hong Lian Jin et al. estudaram células tronco neurológicas humanas modificadas por fator de crescimento endotelial vascular em modelo isquêmico *in vitro* e um modelo isquêmico para lesão medular *in vivo*. Foi realizado laminectomia em ratos, ao nível de T9 e aplicado clip durante 10 minutos provocando lesão medular. Imediatamente após a lesão foram injetadas células tronco neuronais no local da lesão. Encontraram melhor viabilidade celular nos transplantes de células tronco neuronais nas lesões medulares do modelo animal.<sup>70</sup>

Kouhei Yamasaki, em 2009, desenvolveu um modelo de lesão medular em ratos para avaliação imunohistoquímica com o objetivo de avaliar a expressão do fator de células tronco e se a infusão do fator de células tronco intraperitoneal levariam a uma diminuição da apoptose celular após a lesão medular. Os resultados obtidos mostram que a infusão do fator de células tronco intraperitoneal promoveram diminuição da apoptose celular na medula espinhal após o dano medular.<sup>71</sup>

Sachs et al. isolaram linhagens de células tronco múltiplas derivadas de tecido adiposo de vários sítios anatómicos (abdomen, braços / pernas, peito, nádegas), indicando ampla distribuição de ASCs. Afirmaram que existe uma falta generalizada de consenso na literatura quanto às características das células tronco. Descobriram que a atividade da telomerase e expressão da sua subunidade catalítica na ASC são ambos abaixo dos níveis de detecção, independentes da idade e condições de cultura. ASC também sofrem de atrito telômero e, eventualmente, senesce, mantendo ao mesmo tempo um cariótipo estável sem o desenvolvimento de tumores espontâneos. Usando um conjunto de marcadores de superfície celular que foram promovidos para identificar ASC, afirmam que não foi possível distinguir ASCs de fibroblastos normais, já que ambos são positivos para CD29, CD73 e CD105 e negativo para CD14, CD31 e CD45. Todas as células são multipotentes, capazes de se diferenciar em osteócitos, condrócitos e adipócitos, enquanto fibroblastos não mostram nenhum potencial de diferenciação. Concluem que apresentam capacidade de diferenciação e na expressão de genes ligados a pluripotência definindo claramente as ASC como células estaminais multipotenciais, independentemente da localização do tecido isolado.<sup>72</sup>

Park et al. estudaram o transplante de uma massa celular tridimensional de células-tronco adiposas (3DCM-ASC), avaliaram a recuperação funcional do membro

posterior melhorado pela estimulação da angiogênese e neurogênese. Para avaliar o efeito terapêutico de 3DCM-ASC *in vivo*, células-tronco derivadas de tecido adiposo humano, e 3DCM de ASC foram transplantadas para um modelo de lesão medular. Estes resultados evidenciam que o transplante de 3DCM-ASC melhorou significativamente a recuperação funcional comparado com transplante de ASC. Estas descobertas sugerem que o transplante de 3DCM de ASC pode ser uma terapia celular eficaz para o tratamento de lesões da medula espinhal e isquemia neural.<sup>73</sup>

### **3 MÉTODOS**

Este estudo foi realizado seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob registro do projeto no CEUA: 477, data do parecer 21/09/2009 (ANEXO II).

Todos os procedimentos cirúrgicos seguiram as normas do MASCIS.<sup>6</sup> Este protocolo tem por objetivo produzir lesões medulares semelhantes não apenas numa pesquisa, mas em diversos centros certificados, com o objetivo de agrupar dados de estudos similares e obter resultados com maior significado científico.

### 3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 30 ratos *Wistar*, fêmeas e adultos jovens, com média de 20 semanas de idade com peso variando de 300 a 350g, criados no Biotério Central da PUCPR. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, com controle de luz (ciclos claro-escuro de 12 horas) e temperatura ambiente ( $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ ).

Os ratos foram randomizados, identificados um a um e divididos aleatoriamente em três grupos de 10 animais.

O Grupo Controle, composto por 10 animais foi submetido a trauma medular e receberam transplante do meio de cultura sem células, cinco minutos após a lesão medular, atuando como controles negativos do tratamento.

O Grupo Experimental 1, composto por 10 ratos numerados com números pares de dois a vinte, foi submetido ao trauma, e receberam transplante de CTM humanas de tecido adiposo, cinco minutos após a lesão medular, em volume equivalente ao Grupo Controle.

O Grupo Experimental 2, composto por 10 animais numerados por números ímpares de um a dezenove, sofreu o procedimento de lesão medular padronizada e receberam corticoterapia com MP imediatamente após o trauma e depois recebeu transplante de CTM humanas de tecido adiposo, cinco minutos após a lesão medular, em volume equivalente ao Grupo Controle.

### 3.2 INDUÇÃO DO TRAUMA MEDULAR

Todos os ratos foram submetidos à laminectomia e a contusão medular pelo sistema NYU *impactor*.<sup>74</sup>

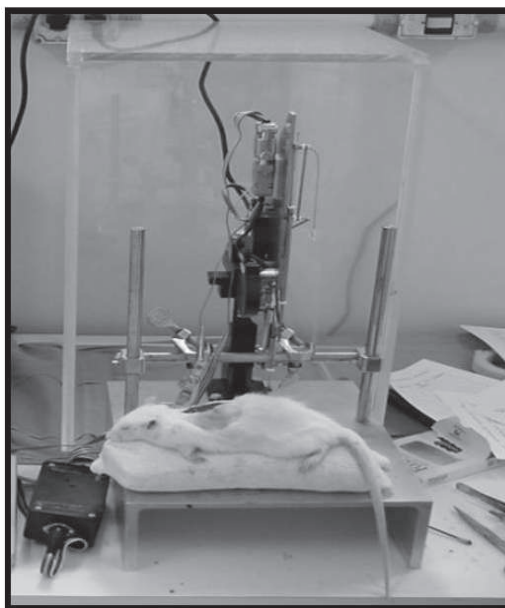


Figura 1: Sistema NYU impactor. *Fonte: Laboratório de Lesões medulares da PUCPR*

Para o procedimento anestésico, foi utilizado pentobarbital intraperitoneal na dose de 65mg/kg. O plano anestésico profundo foi analisado através da ausência do reflexo corneano e de compressão da cauda.

A laminectomia foi realizada para a exposição da medula a qual permitiu o procedimento de contusão. Foi realizada uma incisão na pele da linha média dorsal de aproximadamente cinco centímetros para expor de T8 a T12 da coluna espinhal. Foi removido a metade distal do processo espinhoso de T9 e o processo espinhoso de T10 com um saca-bocado de tamanho apropriado, sem provocar lesão do saco dural. Para esta etapa, utilizou-se lupas para magnificação da imagem.

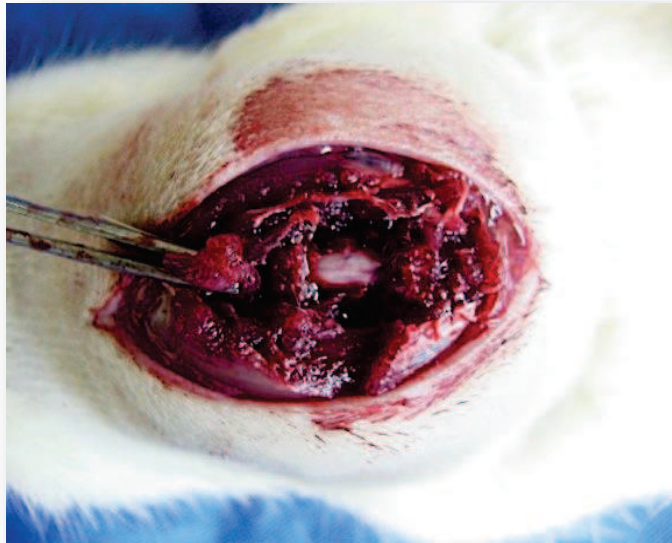


Figura 2: Área de laminectomia e exposição medular. Fonte: Laboratório de Lesões medulares da PUCPR

Para realizar a contusão medular o sistema NYU *impactor* foi utilizado, os ratos foram posicionados no sistema acomodado sobre uma esponja, o segmento T8 a T11 então fixados com presilhas nos processos espinhosos.

Este aparelho, acoplado ao *software* específico, registra dados como a velocidade de queda da haste, o momento do impacto e principalmente a compressão sofrida pela medula espinhal. Os animais foram submetidos à lesão contusa equivalente a queda de 25mm de altura de haste com 10g numa área seccional de 2mm<sup>2</sup>.

Uma vez contusa a medula, foi realizada hemostasia e lavagem do sítio da contusão com soro fisiológico 0,9%. A sutura da ferida foi realizada por planos e a pele fechada com pontos simples utilizando-se fio de nylon monofilamentar número três zeros. O rato foi então transportado para uma câmara com temperatura constante a 30°C, a fim de que se inspecionasse o local da lesão e fosse feita hemostasia, quando necessário.

### 3.3 CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO, CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DAS CTM POR DIFERENCIAÇÃO FUNCIONAL *IN VITRO*, E IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células adiposas humanas foram obtidas de lipossucção cirúrgica sendo identificadas com o número e identificação do doador.



Figura 3: Tecido doado de células adiposas humanas. *Fonte: Laboratório de Engenharia e Transplante Celular da PUCPR*

O cultivo, caracterização e imunofenotipagem da linhagem de CTM utilizada no trabalho foram realizados pela equipe do Prof. Paulo Roberto Brofman, como descrito no protocolo a seguir.

A suspensão de células foi cultivada em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de SFB para célula tronco (Hyclone), 2mM L-glutamina e 5,5 mM glicose e semeadas a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL em placa para cultivo aderente, em estufa a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>. As células que não aderiram em 24 h foram descartadas. Após 10 dias de cultivo, formaram-se colônias com morfologia fibroblastóide. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias e o subcultivo foi realizado antes que o cultivo atingir 80% de confluência. Após o quarto subcultivo, as células foram diferenciadas em adipócito, osteócito e condrócito, para provar a identidade de células mesenquimais progenitoras.

Para verificar a capacidade progenitora das células-tronco, foi avaliada a habilidade dos cultivos primários (4º subcultivo) de se diferenciarem nas linhagens celulares: adipócito, condrócito e osteócito. Após o quarto subcultivo e com 80% de



confluência, os cultivos foram imunomarcados para identificação de fenótipo. Para detectar antígenos superficiais as células foram descoladas com Verseno (EDTA 0,07%), lavadas com PBS, 2% SFB e incubadas 30 min. A 4°C, com os anticorpos específicos para os marcadores respectivos: anti-Thy-1, anti-CD14, anti-CD31 e anti-Sca-1, feitos em coelho. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho, conjugado a FITC, em concentração previamente estabelecida por titulação. Para detectar antígenos intracelulares, as células foram descoladas com tripsina 0,25%, lavadas com PBS, permeabilizadas com etanol 70% ou Triton x100, por 10 min a 4°C e incubadas com os anticorpos: anti-PDX-1, anti-GATA-4, anti-c-kit, e analisados em citômetro de fluxo FACS.

#### 3.4 TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA LESÃO MEDULAR DOS RATOS

As CTM humanas de tecido adiposo foram transplantadas na área da lesão ocasionada na medula dos ratos imediatamente após a lesão. Para tanto, foi realizada injeção direta de  $10^6$  células, utilizando-se seringa de Hamilton com cateter para infusão. Ratos controle receberam apenas o veículo. Os animais foram mantidos sob observação durante 2 horas após a lesão medular.

#### 3.5 MEDICAÇÕES APÓS CONTUSÃO MEDULAR

As medicações foram administradas por via intraperitoneal. Cinco minutos após a lesão, o grupo experimental 2 (n=10) recebeu succinato de MP diluído em 10ml de solução salina fisiológica na dose de 30 mg/kg semelhante ao protocolo realizado em humanos. A infusão foi realizada no quadrante inferior esquerdo do abdome dos animais. Essa dosagem foi administrada 5 minutos após a contusão medular.

A fim de reduzir a taxa de infecção das vias urinárias e da ferida operatória foi utilizada a dose de 25mg/Kg de cefalotina (Keflin®) subcutaneamente após a indução anestésica e repetida seis horas depois e duas vezes ao dia por 48 horas.

#### 3.6 MANEJO PÓS-OPERATÓRIO

Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais que continham água e alimento de fácil acesso, devido a paralisia dos membros posteriores. Os cuidados pós-operatórios incluíram inspeção da ferida e expressão vesical a cada 8 horas, pelo método de Credé, que consistiu em drenagem manual sobre a bexiga.

### 3.7 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DOS RATOS

Os animais foram avaliados quanto à recuperação de movimentos, através de testes físicos, segundo Kuhn e Wrathall, 1998, com modificações. As avaliações motoras foram realizadas no dia da lesão, no 15° e 30° dias após a lesão medular.

Este protocolo atribui pontuações de acordo com o grau de movimento realizado pelo animal em resposta a algum estímulo. Desta forma, foram realizados testes de:

- coordenação motora em campo aberto (Anexo – I A), que avalia suporte de peso, flexão do quadril e distância;
- extensão reflexa dos dedos do pé (Anexo – I B) quando o animal é seguro pelo rabo;
- retirada reflexa dos membros inferiores (Anexo – I C) em direção ao corpo após extensão manual;
- retirada reflexa dos membros em direção ao corpo (Anexo – I D) após estímulo doloroso (picada de agulha);
- reflexo para pronar (Anexo – I E), que avalia tempo de retorno à posição inicial após o animal ser colocado de costas em superfície lisa;
- reflexo de agarrar barra com os pés (Anexo – I F) após toque de barra de pequeno diâmetro nestes membros.

O somatório das pontuações dos ratos de cada tratamento foi comparado entre os tratamentos e entre o tempo de recuperação pós-transplante.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a análise da função motora, realizada por um único observador, realizou-se a análise estatística testando-se a hipótese de nulidade que a adição de

células tronco as lesões medulares e a corticoterapia não trariam diferença estatística entre os grupos estudo e o grupo controle, e a hipótese alternativa para a possibilidade de diferença estatística entre os grupos.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Kruskal - Wallis, também conhecido como *teste H*, com o objetivo de comparar três amostras independentes desiguais considerando resultados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

Para analisar a diferença estatística dentro do mesmo grupo no dia 15 após a lesão e no dia 30 após a lesão medular a análise estatística foi realizada utilizando-se o *test t de Student*, considerando-se resultado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

Todos os animais neste estudo foram submetidos a lesão medular traumática experimental dentro dos padrões previamente estabelecidos pelo protocolo MASCIS.

Três animais do grupo em que foi administrado MP foram a óbito no 13º dia de pós operatório, sendo excluídos da análise estatística.

Três animais do grupo que recebeu transplante de células tronco mesenquimais foram a óbito antes da conclusão da avaliação motora e foram excluídos da análise estatística.

**Tabela 1:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação no 15º dia após a lesão medular utilizando-se o teste de *Kruskal-Wallis*.

GRUPO	Pontuação Motora	Extensão dos Dedos dos Pés	Retirada por Extensão	Retirada por Dor	Reflexo para Pronar	Agarrar Barra com os Pés	Total
<b>CONTROLE</b>	1.8	2.8a	2.1	2.4	2.2	2.4a	13.7
<b>GRUPO - 1</b>	2.5	2.1a	1.4	2	2.4	1.5b	12.1
<b>GRUPO - 2</b>	2.2	2.1b	1.5	2	2.3	1.3b	11.6
<b>H</b>	3.5603	6,7499	4.7518	1.4210	0.3459	9,2372	0.2857
<b>p</b>	0.1686	<b>0,0342</b>	0.0929	0.4914	0.8412	<b>0,0099</b>	0.8669

**H:** teste não-paramétrico de Kruskal –Wallis.

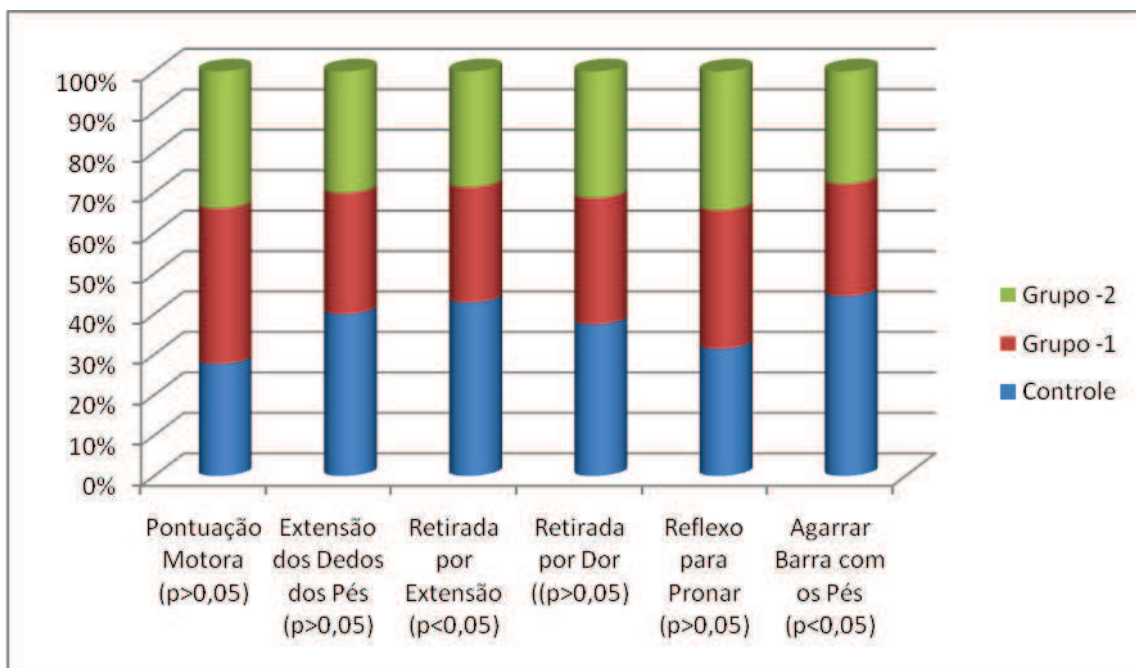
**p:** quando  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa

A avaliação motora seguida de letras diferentes referem-se a valores com diferença estatisticamente significativa. Realizando teste de *Student – Newman-Keuls*.

A avaliação motora da extensão dos dedos dos pés, no décimo quinto dia, evidenciou diferença estatisticamente significativa quando comparados o Grupo Controle e Grupo-2, que recebeu terapia celular e metilprednosolona com  $p < 0,05$ .

A avaliação motora para agarrar Barra com os pés, no décimo quinto dia, evidenciou diferença estatisticamente significativa quando comparados o Grupo Controle e o Grupo-1, que recebeu terapia celular, e quando comparados o Grupo Controle e o Grupo-2, utilizando-se o test-t de *Student-Newman-Keuls*( $p < 0,05$ ).

**Figura 4:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Kuhn e Wrathall*. Avaliação no 15º dia após a lesão medular utilizando-se o teste de *Kruskal-Wallis*.



p: quando  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa

**Tabela 2:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Kuhn e Wrathall*. Avaliação no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o teste de *Kruskal-Wallis*.

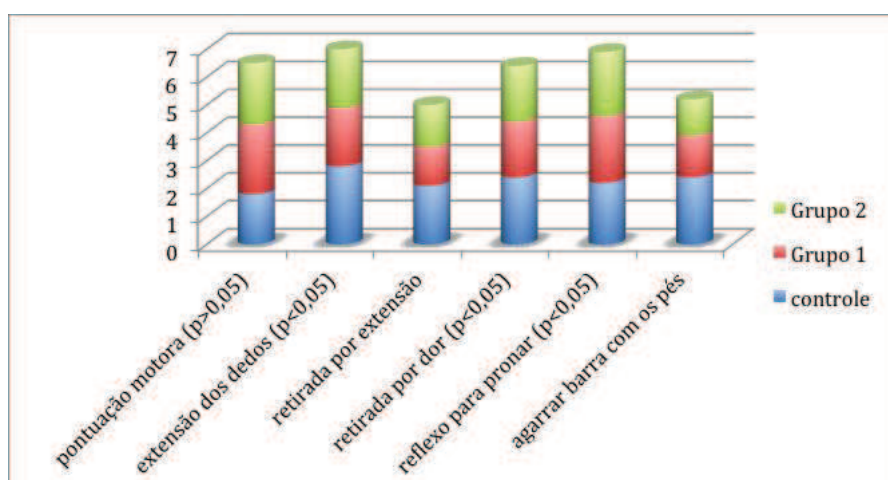
GRUPO	Pontuação Motora	Extensão dos Dedos dos Pés	Retirada por Extensão	Retirada por Dor	Reflexo para Pronar	Agarrar Barra com os Pés	Total
<b>CONTROLE</b>	1.8	2.8a	2.1a	2.4a	2.2a	2.4a	17.9a
<b>GRUPO - 1</b>	2.5	2.1b	1.4b	2.0b	2.4a	1.5b	11.5b
<b>GRUPO - 2</b>	2.2	2.1a	1.5a	2.0b	2.3a	1.3	14.8b
<b>H</b>	0.2354	12,7058	7,4391	14,9626	6,44	16,4988	14,7188
<b>p</b>	0.8890	<b>0,0017</b>	<b>0,0242</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,04</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0006</b>

H: teste não-paramétrico de Kruskal –Wallis.

p: quando  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa

A avaliação motora seguida de letras diferentes referem-se a valores com diferença estatisticamente significativa. Realizando teste de *Student – Newman-Keuls*

**Figura 5:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o teste de *Kruskal-Wallis*.



p: quando  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa

Avaliando-se os grupos no trigésimo dia após a lesão houve diferença estatisticamente significativa nas avaliações motoras da extensão dos dedos dos pés, retirada por extensão, retirada por dor, reflexo para pronar e agarrar barras com os pés.

As avaliações da extensão dos dedos dos pés e retirada por extensão evidenciam diferença estatisticamente significativa comparando-se o Grupo controle com o Grupo-1 e na comparação entre o Grupo-1 e o Grupo-2.

A avaliação da retirada por dor evidenciou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na comparação do Grupo controle com o Grupo-1 e entre o Grupo controle e o Grupo-2.

Na avaliação do reflexo para pronar foi encontrado  $p < 0,05$  no teste de *Kruskal-Wallis*, mas quando realizado avaliação individual com o teste de Student não foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

A avaliação motora agarrar barra com os pés apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos Controle e Grupo-1 ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o *test t de Student*.

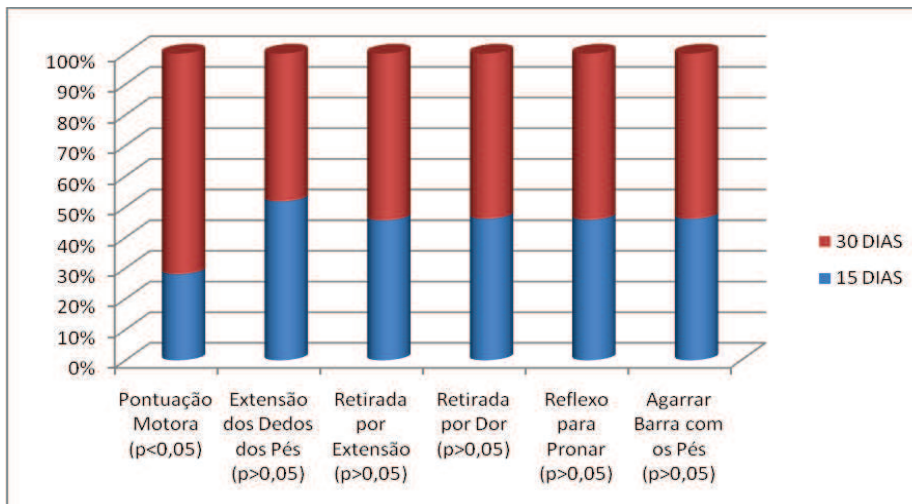
<b>Grupo controle</b>	<b>15 dias Média±Desvio</b>	<b>30 dias Média±Desvio</b>	<b>t</b>	<b>p-valor</b>
Pontuação Motora				
Extensão dos Dedos dos Pés	1,8+0.6325	4.6+0.9661	7.7992	< <b>0.0001</b>
Retirada por Extensão	2.8+0.4216	2.6+0.5164	0.8018	0.2217
Retirada por Dor	2.1+0.7379	2.5+0.5270	1.3093	0.1114
Reflexo para Pronar	2.4+0.8433	2.8+0.4216	1.3093	0.1114
Agarrar Barra com os Pés	2.2+0.7888	2.6+0.5164	1.3093	0.1114
<b>Total</b>	2.4+0.6992	2.8+0.4216	1.5000	0.0839
	13.7+1.2517	17.9+1.3703	6.8739	< <b>0.0001</b>

*Test t de Student* estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$

**p-valor:** quando  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa

A avaliação motora comparativa entre o décimo quinto dia e o trigésimo dia após a lesão evidenciou diferença estatística no grupo controle quanto a pontuação motora e na avaliação da pontuação total ( $p < 0,05$ ) utilizando-se teste t de *Student*. Houve melhora da função motora quando avaliado o parâmetro pontuação motora quando comparados os parâmetros funcionais entre o 15º e o 30º dia.

**Figura 6:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o *test t de Student* (GRUPO CONTROLE).



**p-valor:** quando  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significante



**Tabela 4:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o *test t de Student*.

<b>Grupo 1</b>	<b>15 dias Média±Desvio</b>	<b>30 dias Média±Desvio</b>	<b>t</b>	<b>p-valor</b>
Pontuação Motora				
Extensão dos Dedos	2.5+0.7868	4.5+1.3973	3.7417	<b>0.0048</b>
dos Pés	2.1+0.6901	0.8+0.8997	2.4648	<b>0.0244</b>
Retirada por	1.4+0.5345	1.2+0.7559	0.4201	0.3445
Extensão	2.0+1.0690	1.1+1.0	1.3530	0.1124
Retirada por Dor				
Reflexo para Pronar	2.4+0.5345	3.0+0.0	2.8284	<b>0.0150</b>
Agarrar Barra com os Pés	1.5+0.5345	0.7+0.7559	2.5205	<b>0.0226</b>
<b>Total</b>	12.1+1.4639	11.5+3.7796	0.3179	0.3807

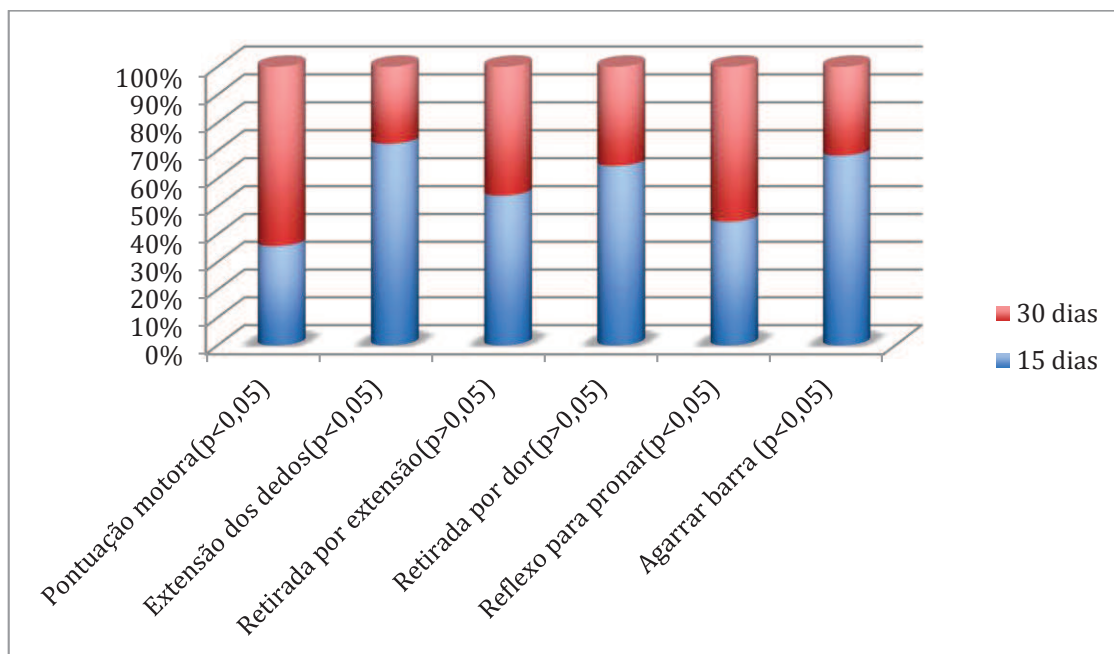
*Test t de Student* estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$

**p-valor:** quando  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa

Comparando-se a avaliação motora no 15º e 30º dias após a lesão medular houve diferença estatisticamente significativa nas avaliações da pontuação motora, extensão dos dedos, reflexo para pronar e agarrar barra com os pés ( $p < 0,05$ ).

Houve melhora da função motora quando avaliados os parâmetros pontuação motora e reflexo para pronar. Nos outros parâmetros a diferença estatisticamente significativa deveu-se a piora da função ( $p > 0,05$ ).

**Figura 7:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o *test t de Student* (GRUPO – 1).



**p-valor:** quando  $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa

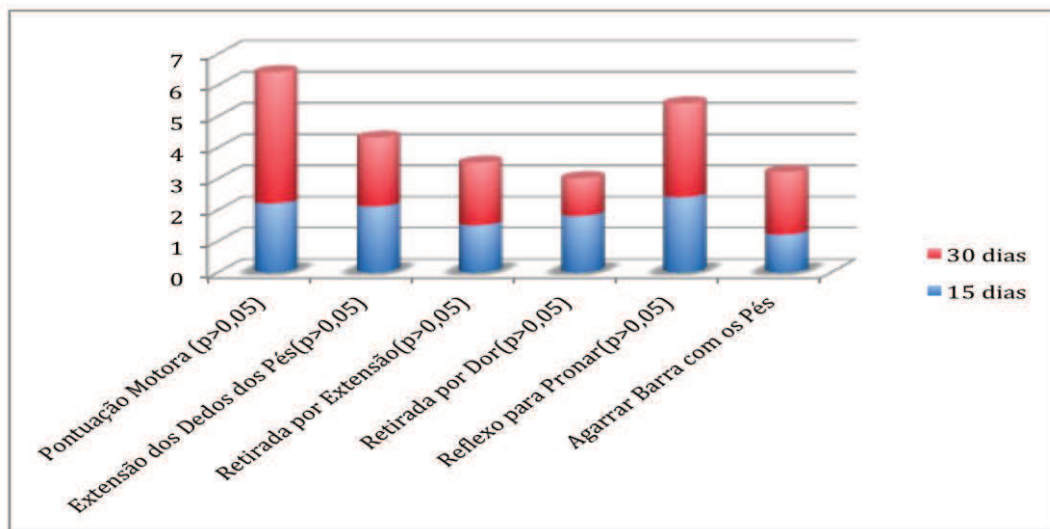
**Tabela 5:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o *test t de Student*.

Grupo 2	15 dias Média±Desvio	30 dias Média±Desvio	t	p-valor
Pontuação Motora				
Extensão dos Dedos	2.2+1.3801	4.2+1.4960	2.6458	<b>0.0191</b>
Extensão dos Pés	2.1+0.6901	2.2+0.4880	1.0000	0.1779
Retirada por	1.5+0.5345	2.0+1.1547	0.8911	0.2036
Extensão	1.8+0.6901	1.2+0.7559	1.1882	0.1398
Retirada por Dor				
Reflexo para Pronar	2.4+0.5345	3.0+0.0000	2.8284	<b>0.0150</b>
Agarrar Barra com os Pés	1.2+0.4880	2.0+0.5774	2.5000	<b>0.0232</b>
<b>Total</b>	11.5+2.6	14.8+1.3	2.4850	<b>0.0237</b>

*Test t de Student* estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$

A avaliação motora comparativa dentro do Grupo-2 não evidenciou diferença estatisticamente significativa quando comparados no décimo quinto dia e no trigésimo dia ( $p>0,05$ ).

**Figura 8:** Avaliação motora segundo o *Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos a Trauma Medular de Kuhn e Wrathall*. Avaliação comparativa no 15º e no 30º dia após a lesão medular utilizando-se o *test t de Student* (GRUPO 2).



**p-valor:** quando  $p<0,05$  diferença estatisticamente significativa

A avaliação motora comparativa entre o décimo quinto dia e o trigésimo dia após a lesão, nos animais que fizeram parte do grupo que recebeu corticoterapia, não evidenciou diferença estatisticamente significativa. Funcionalmente não houve melhora na avaliação motora ( $p<0,05$ ). Foi utilizado o *teste t de Student* para avaliação comparativa.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo seguimos a linha de pesquisa desenvolvida por Vialle et al<sup>6,35,36</sup> que estuda as lesões medulares em ratos e iniciamos as avaliações motoras com o uso de terapia celular.

Utilizamos o sistema NYU de lesão medular por obtermos um padrão de repetição com menor variável e seguindo o protocolo determinado pelo Laboratório de Engenharia e Transplante Celular realizamos as infusões de células mesenquimais extraídas de tecido adiposo humano.

As lesões medulares em humanos ocorrem em sua grande maioria pelo movimento rápido da coluna posterior da vértebra com impacto do osso sobre a medula<sup>30,31</sup> de acordo com isso o modelo de impacção por queda de peso oferece a vantagem de ser clinicamente relevante.

Gruner<sup>34</sup>, em 1992, desenvolveu o sistema NYU que permite a avaliação e o controle de alguns parâmetros biomecânicos como a velocidade de impacto, taxa de compressão medular e a força dinâmica aplicada à medula, promovendo lesão com poucas variáveis. O sistema consiste em um modelo de queda de haste de 10g de diferentes alturas sobre a medula exposta: 6,25mm, 12,5mm, 25mm e 50mm.

Seguindo a padronização feita por Vialle et al, optamos pela utilização de queda de peso da altura de 25mm, pois estudos anteriores demonstram que a altura de 50mm está associada a uma alta taxa de mortalidade e provoca lesão completa impossibilitando estudos de recuperação, e na lesão provocada por 12,5mm ocorre a recuperação funcional completa mesmos nos ratos sem tratamento nos primeiros dez dias.<sup>35</sup>

A lesão mecânica primária é determinada pelas circunstâncias do trauma é geralmente irreversível, após essa lesão ocorre uma cascata de eventos biológicos que resultam na lesão medular secundária, que pode ser amenizada pela ação terapêutica de drogas neuroprotetoras.<sup>3,32,75</sup>

Estudos experimentais permitiram melhor compreensão das alterações fisiopatológicas da lesão medular secundária o que possibilitou o desenvolvimento e o estudo de drogas que agissem diretamente impedindo a cascata bioquímica com o

objetivo de diminuir a progressão e até promover a recuperação da função neurológica.<sup>3,75,76,77,78</sup>

As duas drogas de uso clínico estabelecido e reconhecido para o tratamento da lesão medular aguda em humanos são a MP e o gangliosídeo GM-1, e, segundo alguns autores, o uso em conjunto dessas drogas pode promover ação sinérgica no tratamento desses pacientes.<sup>79</sup>

A dosagem de MP já foi bem estudada e estabelecida na literatura (30mg/kg), variando apenas no tempo em que é utilizada. Estudos experimentais em ratos sugerem um tempo limite de 30 minutos após o trauma (janela terapêutica) para a administração da MP.<sup>15,25,79</sup>

Optamos pelo uso da MP em nosso estudo, pois vários autores tem demonstrado benefícios clínicos com melhora da função neurológica em seus experimentos.<sup>43,47</sup>

Muitos mecanismos relacionados ao efeito neuroprotetor da MP são mencionados na literatura como a preservação do tecido medular, o aumento da microcirculação e diminuição da quantidade de ATP,<sup>80</sup> a diminuição do acúmulo de lactato e piruvato,<sup>12</sup> a manutenção do fluxo sanguíneo medular dentro da normalidade,<sup>69</sup> a capacidade de inibir os radicais livres de oxigênio induzidos pela peroxidação lipídica,<sup>14</sup> a diminuição do volume da lesão,<sup>29</sup> a melhora da regeneração dos axônios, a redução da cascata de efeitos secundários após o trauma agudo, a diminuição da isquemia medular, inibindo o aumento da permeabilidade vascular no local lesado na medula e a redução do edema grave, preservando a arquitetura da medula adjacente.<sup>81</sup>

Baseados no estudo de Yoon et al.<sup>79</sup> aplicamos nos ratos uma dose de 30mg/Kg de MP seguida de transplante de CTM humanas de tecido adiposo, cinco minutos após a lesão medular.

Estudos histológicos realizados por Carvalho<sup>8</sup> evidenciaram áreas de necrose na região dorsal da medula, sendo mais intensas no sítio de lesão, mas claramente presentes nas três regiões de cortes histológicos em todos os segmentos estudados. Isto indica que ocorre lesão necrótica na medula, após a lesão traumática, envolvendo grande parte de sua secção transversa e estendendo-se em direção cranial e caudal numa área aproximada de um centímetro. Acreditamos que estes

achados se devam a uma cascata de eventos biológicos secundários que ocorrem após o infarto da medula, derivados da isquemia produzida pela lesão contusa.<sup>32,82</sup>

Vários autores têm demonstrado que o edema inicialmente se desenvolve no local da lesão e posteriormente invade os segmentos adjacentes<sup>3,32,83</sup> decorrente de um processo inflamatório secundário ao trauma agudo.

A presença de áreas cavitárias circundadas por células não neuronais (macrófagos e leucócitos) como processo inflamatório local possuíam margens bem definidas e eram adjacentes às áreas de necrose, indicando alterações progressivas que provavelmente são originárias de uma hemorragia que evoluiu para necrose e, posteriormente, para cavitação. Esta seqüência de eventos patológicos foi denominada por Sandler e Tator<sup>84</sup> como processo de “infarto pós-traumático”.

Nestes estudos, o uso de corticóides não afetou a extensão da morte celular. Estes achados conferem um aspecto importante: o fato de que, o que foi demonstrado ausência de diferença estatística entre os grupos em relação à necrose que ocorreu na região dorsal dos segmentos de medula estudados, o que foi concordante com os achados de Bartholdi e Schwab.<sup>85</sup>

Alguns autores têm demonstrado que o edema se inicia e atinge seu auge nas primeiras 48 horas e depois vai sendo reabsorvido lentamente retornando aos padrões iniciais.<sup>30,78,86</sup>

A ação da MP na preservação de substância branca é controversa, onde da mesma forma que alguns experimentos de lesão medular em ratos com análise histológica têm demonstrado que a utilização da MP aumenta o volume de substância branca preservada<sup>76,82</sup> outros autores concluem que ocorre diminuição do volume de tecido residual.<sup>81</sup>

O uso da MP em ratos com lesão contusa da medula não tem demonstrado ser capaz de preservar substância cinzenta.<sup>81,87</sup>

Acreditamos que os mecanismos pelo qual uma droga específica melhora o resultado funcional podem ou não ser reflexo de alterações morfológicas. Sendo assim, a base para que exista uma recuperação considerável da função é desconhecida e pode envolver diferentes mecanismos, como reorganização apropriada do meio ambiente iônico, remielinização e crescimento axonal, que ocorrem em diferentes momentos após a lesão e podem ser influenciados pelo uso de drogas.

Estudos experimentais têm demonstrado melhora da função motora e das sensações em avaliações clínicas de pacientes com lesão medular completa (ASIA A). Em nosso estudo, a avaliação motora no 15º dia não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), não evidenciando melhora quando comparados os grupos.

Continuando a avaliação motora até o 30º dia, os testes estatísticos evidenciaram diferença significativa quando avaliada a função motora entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Estes dados sugerem que o seguimento a longo prazo trazem bons resultados funcionais quando utilizadas terapias celulares em lesões medulares completas. Houve melhora funcional motora nos grupos I e II após a terapia celular quando avaliados os parâmetros motores no 15º e 30º dia.

Quando avaliados os grupos em separado, algumas funções motoras não tiveram melhora. No grupo 1, que recebeu terapia celular comparando-se as avaliações no 15º e no 30º dia houve diferença estatisticamente significativa em quatro critérios testados. Estes achados mostram-se positivos para esta etapa da pesquisa devendo-se ser discutido outras formas de avaliação menos subjetivas.

A avaliação motora para o grupo 2, que recebeu terapia celular e corticoterapia, não evidenciou diferença quando comparados no décimo quinto e trigésimo dia pós lesão medular com o grupo estudo que recebeu apenas terapia celular. Estes dados discordam de estudos funcionais publicados nos quais foram encontrados melhora funcional quando utilizado corticoterapia em lesões medulares em ratos. Estes achados preliminares não tornam-se verdades absolutas, devendo-se aprofundar os estudos e a ação sinérgica entre a terapia celular e a corticoterapia com MP.

## **6 CONCLUSÃO**

O uso da metilprednisolona não promoveu melhoras funcionais no estudo motor dos animais submetidos a lesão medular completa.



## 7 REFERÊNCIAS

1. Segun, T; Dawodu, JD. Spinal Cord Injury: Definition, Epidemiology, Pathophysiology. *Physical Medicine and Rehabilitation*. Internet. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/322480-print>. Acesso em: 28 março. 2008.
2. Tator, CH; Fehlings, MG. Review of secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*. 1991;75(1):15-26.
3. Cunha, RC. Efeitos funcionais da terapia autóloga de células tronco derivadas da medula óssea (CD45 e CD34) no trauma raquimedular agudo nos murinos: sedentários e treinados físicos [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2008.
4. Burney, RE; Maio, RF; Maynard, F; Karunas, R. Incidence, characteristics, and outcome of spinal cord injury at trauma centers in North America. *Arch Surg*. 1993; 128(5):596-9.
5. Ducker, TB; Zeidman, SM. Spinal Cord Injury: Role of steroid therapy. *Spine*. 1994;19(20): 2281-7.
6. Vialle, EN. Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
7. Caroline, J; Vogel, LC; Chlan, KM; Betz, RR. Coping With Spinal Cord Injury: Strategies Used by Adults Who Sustained Their Injuries as Children or Adolescents. *J Spinal Cord Med*. 2008; 31:290–6.
8. Carvalho, MOP. Análise histomorfométrica e da recuperação da função locomotora em ratos com lesão medular: efeitos da metilprednisolona e do GM-1 [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

9. Allen, AR. Surgery of experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation. Preliminary report. *J Am. Med Assoc.* 1911;57:878 - 80.
10. La Rosa, G; Conti, A; Cardali, S; Cacciola, F; Tomasello, F. Does early decompression improve neurological outcome of spinal cord injured patients? Appraisal of the literature using a meta-analytical approach. *Spinal Cord.* 2004;42(9):503-12.
11. Legos, JJ; Gopez, JJ; Young, WF. Non surgical management of spinal cord injury. *ExprtOpinInvestig Drugs.* 2002; 11(4):469-82.
12. Geisler, FH; Coleman, WP; Grieco, G; Poonian, D. The Sygen<sup>®</sup> multicenter acute spinal cord injury study. *Spine.* 2001;26(24):87-98.
13. Constantini, S; Young, W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 1994;80(1):97-111.
14. Nash, HH; Borke, RC; Anders, JJ. Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 2002;22(16):7111-20.
15. Lee, BH; Lee, KH; Yoon, DH; Kim, UJ; Hwang, YS; Park, SK; Choi, JU; Park, YG. Effects of methylprednisolone on the neural conduction of the motor evoked potentials in spinal cord injured rats. *J Korean Med Sci.* 2005;20(1):132-8.
16. Hung, KS; Tsai, SH; Lee, TC; Lin, JW; Chang, CK; Chiu, WT. Gene transfer of insuline-like growth factor-I providing neuroprotection after spinal Cord injury in rats. *J Neurosurg Spine.* 2007;6(1):35-46.
17. Tarasenko, YI; Gao, J; Nie, L; Johnson, KM; Grady, JJ; Hulsebosch, CE; McAdoo, DJ; Wu, P. Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior. *J Neurosci Res.* 2007;85(1):47-57.
18. Albin, MS. White RJ. Epidemiology, physiopathology, and experimental therapeutics of acute spinal cord injury. *CritCareClin.* 1987; 3(3):441-52.

19. Galvão, PEC. Avaliação funcional e histológica do efeito da oxigenoterapia hiperbárica em ratos com lesão medular contusa [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.
20. Akesson, E; Holmberg, L; Jönhagen, ME; Kjaeldgaard, A; Falci, S; Sundström, E; Seiger A. Solid human embryonic spinal cord xenografts in acute and chronic spinal cord cavities: a morphological and functional study. *Exp Neurol.* 2001;170(2):305-16.
21. McDonald, JW; Howard, MJ. Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. *Prog Brain Res.* 2002;137:299-309.
22. Kaptanoglu, E; Solaroglu, I; Okutan, O; Surucu, HS; Akbiyik, F; Beskonaki, E. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal Cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev.* 2004;27(2):113-20.
23. Kimura, H; Yoshikawa, M; Matsuda, R; Toriumi, H; Nishimura, F; Hirabayashi, H; Nakase, H; Kawaguchi, S; Ishizaka, S; Sakaki, T. Transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells for spinal cord injury in adult mice. *Neurol Res.* 2005;27(8):812-9.
24. Urdzíkuvá, L; Jendelová, P; Glogarová, K; Burian, M; Hájek, M; Syková, E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 2006;23(9):1379-91.
25. Cízková, D; Rosocha, J; Vanicky, I; Jergová, S; Cízek, M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol Neurobiol.* 2006; 26(7-8):1167-80.
26. Vitellaro-Zuccarello, L; Mazzetti, S; Madaschi, L; Bosisio, P; Gorio, A; De Biasi S. Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience.* 2007; 144(3):865-77.

27. Hall, ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do build on past success? *J Spinal Cord Med.* 2001; 24(3):142-6.
28. Pereira, LV. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2008; 13:7-14.
29. Krause, DS; Theise, ND; Collector, MI; Henegariu, O; Hwang, S; Gardner, R; Neutzel, S; Sharkis, SJ. Multiorgan, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-377.
30. Zuk, A; Zhu, M; Ashjian, P; De Ugarte, DA; Huang, JI; Mizuno, HH; Alfonso, ZC; Fraser, JK; Benhaim, P; Hedrick, MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13:4279-95.
31. Lee, RH; Kim, BC; Choi, I; Kim, H; Choi, HS; Suh, KT; Bae, YC; Jung, JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell PhysiolBiochem.* 2004;14:311-324.
32. Kima, YJ; Kima, HK; Choa, HH; Baed, YC; Suhe, KT; Junga, JS. Direct Comparison of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissues and Bone Marrow in Mediating Neovascularization in Response to Vascular Ischemia. *Cell PhysiolBiochem* 2007; 20:867-876.
33. Yarak, S; Okamoto, OK. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *AnBrasDermatol.* 2010; 85(5):647-56.
34. Gruner, JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma.* 1992;9(2):123-6.
35. Vialle, LRG. Instalação de um sistema de estudo de lesões medulares experimentais em animal. Tese (Doutorado); Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
36. Vialle, LRG et al. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev. Bras. Ortop., Rio de Janeiro,* 1999;34:85-89.

37. Behrmann, DL; Bresnahan, JC; Beattie, MS; Shah, BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma*. 1992; 9(3):197-217.
38. Rodrigues, NR. Padronização da lesão na medula espinhal em ratos wistar [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1999.
39. Delamarter, RB; Sherman, J; Carr, JB. Pathophysiology of spinal cord injury. *Jour. Boneand Joint Surg*. 1995;77(7):1042-1049.
40. Ildan, F; et al. correlation of alterations on Na(+)-K+Mg+2 ATPase activity, lipid peroxidation and ultrastructural findings following experimental spinal cord injury with and without intravenous methylprednisolone treatment. *Neurosurg. Rev.*, Berlin, 1995; 18:35-44.
41. Topsakal, C. Effects of methylprednisolone and dextromethorphan on lipid peroxidation in an experimental model of spinal cord injury. *Neurosurg. Rev.*, Berlin, 2002;25:258-266.
42. Hall, ED; Braugher, JM. acute effects of intravenous glucocorticoid pretreatment on the in vitro peroxidation of cat spinal cord tissue. *Exp. Neurol.*, Orlando,1981; 73:321-324.
43. Hall, ED; Wolf, DL; Braugher, JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental post traumatic spinal cord ischemia: dose response and time-action analysis. *J Neurosurg*. 1984; 61(1):124-30.
44. Hall, ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg*. 1992; 76(1):13-22.
45. Bracken, MB; Collins, WF; Freeman, DF. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA*, Chicago, 1984;251:45-52.
46. Anderson, TE; Stokes, BT. Experimental models for spinal cord injury research: physical and physiological considerations. *J. Neurotrauma*, New York, 1992;9:135-142.

47. Bracken, MB; Holford, TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg.*1993;79(4):500-7.
48. Prendergast, MR; et al. massive steroids do not reduce the zone of injury after penetrating spinal cord injury. *J. Trauma Injury Infect. Crit. Care*, 1994;34:576-580.
49. Poyton, AR; et al. Na evaluation of the factors affecting neurological recovery following spinal cord injury. *Injury*, 1997;28:545-548.
50. Gebrin, AS; Cunha, AS; Silva, CF; Barros Filho, TEP; Azze, RJ. Perspectivas de recuperação do lesado medular. *Rev.Bras.Ortop.*1997 b; 32(2):103-8.
51. Kaptanoglu, E. et al. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 2000;93:77-84.
52. Baffour, R; et al. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and methylprednisolone on neurological function after experimental spinal cord injury. *J. neurosurg.*, Baltimore, v. 83, p.105-11, 1995.
53. Fukaya, C; Katayama, Y; Kasai, M; Kurihara, J; Maejima, S; Yamamoto, T. Evaluation of time-dependent spread of tissue damage in experimental spinal cord injury by killed-end evoked potential: effect of high-dose methylprednisolone. *J Neurosurg.* 2003; 98(1):56-62.
54. Tator, CH; Fehlings, MG; Thorpe, K; Taylor, W. Current use and timing of spinal surgery for management of acute spinal surgery for management of acute spinal cord injury in North America: results of a retrospective multicenter study. *J Neurosurg.* 1999; 91(1):12-8.
55. Kwon, BK; Sekhon, LH; Fehlings, MG. Emerging Repair, Regeneration, and Translational Research Advances for Spinal Cord Injury. *Spine*: 1 October, 2010; 35 (21):263-270.

56. Deda, H; İnci, Mc; et al. Treatment of chronic spinal cord injured patients with autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: 1-year follow-up. *Cytotherapy*. 2008;10(6):565-74.
57. Syková, E; Homola, A; Mazanec, R; Lachmann, H; Konrádová ,SL; Kobylka, P; Pádr, R; Neuwirth, J; Komrska, V; Vávra, V; Stulík, J; Bojar, M. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2006;15(8-9):675-87.
58. Basso, DM; Alexander, M; Beattie, MS; Bresnahan JC. A new more sensitive scale for measuring locomotor recovery after spinal cord injury in rat. *J Neurotrauma*. 1994;11:103.
59. Setoguchi, T; Kazunori, Y; Setsuro, K; Takeshi, T. Expression of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Mouse Spinal Cord Under Chronic Mechanical Compression: Possible Involvement of the Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Spinal Cord Cell Apoptosis. *Spine*: 15 August; 2008;33(18):1943-1950.
60. Tello; Cajal. Citado por Vialle, EN. Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos (dissertação). Paraná: Universidade Federal do Paraná; 2005.
61. Raisman, G. Olfactory ensheathing cells - another miracle cure for spinal cord injury? *Nat Rev Neurosci*; 2001, 2:369-375.
62. Hill, CE; Pröschel, C; Noble, M; Mayer-Pröschel, M; Gensel, JC; Beattie, MS; Bresnahan, JC. Acute transplantation of glial-restricted precursor cells into spinal cord contusion injuries: survival, differentiation and effects on lesion environment and axonal regeneration. *Exp Neurol* 2004;190:289-310.
63. Nakamura, M; Okano, H; Toyama, Y; Dai, HN; Finn, TP; Bregman, BS. Transplantation of embryonic spinal cord-derived neurospheres support growth of supraspinal projections and functional recovery after spinal cord injury in the neonatal rat. *J Neurosci Res*, 2005; 81:457-468.

64. Davies, JE; Pröschel, C; Zhang, N; Noble, M; Mayer-Pröschel, M; Davies, SJ. Transplanted astrocytes derived from BMP- or CNTF-treated glial-restricted precursors have opposite effects on recovery and allodynia after spinal cord injury. *J Biol* 2008, 7:24 *J Biol*. 2008 Sep 19; 7(7):24.
65. Hofstetter, CP; Holmstrom, NA; Lilja, JA; Schwainhardt, P; Hao, J; Spenger, C; Wiesenfeld-Hallin, Z; Kurpad, SN; Frisen, J; Olson, L. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* 2005;8:346-353.
66. Park, JH; Sung, IY; Choi, GH; Jeon, MH; Kim DY; Kim, K; Jeon, SR. Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery*. 2012; 70(5):1238-47.
67. Pal R, Venkataramana NK, Bansal A, Balaraju S, Jan M, Chandra R, Dixit A, Rauthan A, Murgod U, Totey S. Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. *Cytotherapy*. 2009;11(7):897-911.
68. Baer, PC; Geiger, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International*. Volume 2012 (2012), Article ID 812693, 11 pages.
69. Chua, SJ; Bielecki, R; Wong, CJ; Yamanaka, N; Rogers, IM; Casper, RF. Neural progenitors, neurons and oligodendrocytes from human umbilical cord blood cells in a serum-free, feeder-free cell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 2009;379(2):217-221.



70. Jin, HL; Sung, SA; Kim, KN; Kim, DS; Cho, J; Liu, ML; Oh, JS; Yoon, DH; Lee, MH; Ha, Y. Neuroprotective effect of combined hypoxia-induced VEGF and bone marrow-derived mesenchymal stem cell treatment. *Childs Nerv Syst.* 2010; 26(3):323-31.
71. Kouhei Y; Setoguchi, T; Takenouchi, T; Yone, K; Komiya, S. Stem Cell Factor Prevents Neuronal Cell Apoptosis After Acute Spinal Cord Injury *Spine*, 2009;34:323-327.
72. Sachs, PC; Francis MP, Zhao M, Brumelle J, Rao RR, Elmore LW, Holt SE. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell Tissue Res.* 2012 May 25. [Epub ahead of print]
73. Oh, JS; Park, IS; Kim, KN; Yoon do, H; Kim, SH; Ha, Y. Transplantation of an adipose stem cell cluster in a spinal cord injury. *Neuroreport.* 2012 Mar 28;23(5):277-82.
74. Kuhn, PL; Wrathall, JR. A mouse model of graded contusive espinal cord injury. *J. Neurotr.* 1998;15(2):125-140.
75. Tebet, MA. Efeito da metilprednisolona e do gangliosídeo GM-1 na lesão medular em ratos: análise funcional e histológica [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.
76. Faden, AI; Chan, PH; Longar, S. Alterations in lipid metabolism, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase activity, and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury. *J Neurochem*,1987;48(6)1809-16.
77. Noble, LJ; Wrathall, JR. Spinal cord contusion in the rat:morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp. Neurol.* 1985; 88(1):135-49.
78. Noble, LJ; Wrathall, JR. Correlative Analyses of lesion development and functional status after graded spinal cord contusive injuries in the rat. *Exp. Neurol.* 1989; 103(1):34-40.
79. Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal Cord injured rat. *Yonsei Med J.* 1999;40(4):313-20.

80. Anderson, DK; Means, ED; Waters, TR. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg.* 1982;56(1):106-13.
81. Merola, A; O'Brien, MF; Castro, BA; Smith, DA; Eule, JM; Lowe, TG; Dwyer, AP; Haheer, TR; Espot, NJ. Histologic characterization of acute spinal cord injury treated with intravenous methylprednisolone. *J Orthop Trauma.* 2002;16(3):155-61.
82. Balentine, JD. Pathology of experimental spinal cord trauma I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest.* 1978;39(3):236-53.
83. Bresnahan, JC; Beattie, MS; Todd III, FD; Noyes, DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp. Neurol.* 1987;95(3):548-70.
84. Sandler, AN; Tator, CH. Effect of acute spinal cord compression injury on regional spinal cord blood flow in primates. *J Neurosurg.* 1976;45(6):660-76.
85. Bartholdi, D; Schwab, ME. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci.* 1997;9(7):1422-38.
86. Rabchevsky, AG; Fugaccia, I; Sullivan, PG; Blades, DA; Scheff, SW. Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. *J Neurosci Res.* 2002;68(1): 7-18.
87. Takami, T; Oudega, M; Bethea, JR; Wood, PM; Bunge, MB. Methylprednisolone and interleukin-10 reduce gray matter damage in the contused Fischer rat thoracic spinal cord but do not improve functional outcome. *J Neurotrauma.* 2002;19(5):653-66.

## ANEXO I

### Protocolo de Avaliação Motora de Ratos Submetidos à Trauma Medular

Modificado de Kuhn e Wrathall, 1998

#### A) Pontuação Motora

- (0) – Sem movimentos dos membros, não suporta peso nos membros;
- (1) – Movimentos perceptíveis, não suporta peso nos membros;
- (2) – Freqüente ou vigoroso movimento dos membros, não suporta peso nos membros;
- (3) – Suporta peso nos membros, consegue 1 ou 2 passos;
- (4) – Suporte completo do peso, caminha usando porção distal dos membros, flexão limitada do quadril;
- (5) – Caminha com leve déficit apenas;
- (6) – Total alcance (distância, percurso e extensão) da mobilidade de todas as articulações.

#### B) Extensão dos Dedos do Pé

- (0) – Nenhuma extensão;
- (1) – Extensão mínima, manca com a coxa;
- (2) – Extensão normal dos dedos do pé;
- (3) – Hiperextensão, tremendo os dedos.

#### C) Retirada por Extensão

- (0) – Sem retirada de flexão;
- (1) – Fraco, movimento lento em direção ao corpo;
- (2) – Retirada normal dos membros inferiores em direção ao corpo;
- (3) – Hiperflexão dos membros inferiores, tremendo.

#### D) Retirada por Dor

- (0) – Sem reação;
- (1) – Empurra com o pé, mas não recolhe o membro;
- (2) – Retirada normal (rápida) dos membros inferiores em direção ao corpo;
- (3) – Hiperflexão dos membros inferiores, tremor espástico.

#### E) Reflexo para Pronar

- (0) – Animal permanece em posição supina;
- (1) – Retorno lento para posição pronada (maior que 5");
- (2) – Retorno médio para posição pronada;
- (3) – Retorno rápido para posição pronada (menor que 0,5").

#### F) Agarrar Barra com Pés

- (0) – Sem resposta ao toque da barra contra o pé;
- (1) – O pé responde mas não agarra a barra;
- (2) – Agarra fracamente;
- (3) – Agarra forte e empurra.



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA**

**Registro do projeto no CEUA: 477**

**Data do parecer: 21/09/2009**

**Título do Projeto:**

Estudo da influência da corticoterapia sobre a terapia celular em ratos submetidos a lesão medular

**Pesquisador responsável:**

Estudo da influência da corticoterapia sobre a terapia celular em ratos submetidos a lesão medular

**Equipe da pesquisa:**

Luiz Roberto Vialle

**Instituição:**

PUCPR

**Categoria do Experimento – C**

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Rattus norvegicus</i>	Macho	300 a 350g	10

O colegiado do CEUA em reunião no dia 17/09/2009, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

**Obs. Ajustar o cronograma.**

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

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



Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Curitiba, 21 de setembro de 2009.

Atenciosamente

Profa. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira  
Coordenadora do CEUA  
PUC PR

