

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

ANTÔNIO FILIPE BRAGA DA FONSECA

**TERAPIA CELULAR APLICADA À LESÃO MEDULAR INDUZIDA EM
COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2015

ANTÔNIO FILIPE BRAGA DA FONSECA

**TERAPIA CELULAR APLICADA À LESÃO MEDULAR INDUZIDA EM
COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2015

ANTÔNIO FILIPE BRAGA DA FONSECA

**TERAPIA CELULAR APLICADA À LESÃO MEDULAR INDUZIDA EM
COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Tese de doutorado apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.

BANCA EXAMINADORA

Doutor Jorge Luiz Costa Castro (Doutor, Universidade Federal de Santa Maria-UFSC, Professor Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária – PUCPR)

Doutor Arthur Giraldo Guimarães (Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro Ciências – Biofísica; Professor associado – UENF)

Doutor André Lacerda de Abreu Oliveira (Doutor, Medicina- Cirurgia Geral – UFRJ, Professor associado – UENF)

Doutor Arnaldo Rocha Façanha (Doutor, Química Biológica – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Professor associado – UENF)

A minha família,
Araceli Otero Pastoriza (esposa) e Luiza Otero da Fonseca (filha),
por tornarem possível a realização desse sonho.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por estar vivo e por ser o caminho nos momentos de incertezas, me dando força para que eu pudesse enfrentar todos os obstáculos encontrados durante essa jornada.

Agradeço também pelas pessoas tão especiais que Ele colocou na minha vida e que foram essenciais para a minha formação tanto profissional, quanto pessoal.

À minha família, por todo amor, apoio e dedicação desde sempre e por ser à base de tudo na minha vida. Em especial a minha filha, Luiza Otero da Fonseca (a única coisa realmente importante que fiz na vida), minha esposa, Araceli Otero Pastoriza, meu amor e meu esteio, meus pais, Claudelina Braga, a grande culpada de tudo e Antonio Emir Baptista da Fonseca (*in memorian*).

A Claudina Braga, Glória Luiza Braga, Benito Otero Rocha, Izabel Amorim e todos os seres de Luz pela onipotência de Fé que me transmitiram do outro plano

Ao Professor Dr. André Iaccerda de Abreu Oliveira pela orientação, confiança e mais que tudo a grande, antiga e eterna amizade.

Ao Professor Dr. Arthur Giraldi Guimarães pela super coorientação, interesse, dedicação, competência, ensinamentos e começo de uma grande amizade.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Jorge Luiz Costa Castro, Prof Doutor Arnaldo Rocha Façanha, por se disponibilizarem a avaliar este trabalho.

Ao Professor Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho pelo auxílio nas análises histopatológicas estatísticas e amizade.

Aos Professor Dr. Edmundo Abílio e Prof.(a) Fernanda Antunes pelo apoio logístico, aconselhamentos e amizade.

A todo o grupo de alunos e professores da Faculdade de Medicina veterinária da Universidade Federal de Santa Maria em especial a Graciane Aiello que mesmo no momento de luto de toda esta cidade, me receberam e possibilitaram a realização do piloto deste experimento.

As Tera amigas e Jussara Peters Scheffer e Bárbara de Paula Coelho, sem as quais esta tese não existiria. Juntando a disposição, organização, competência, juventude e vontade de ajudar dessas duas sai da frente.

Aos Giga amigos e colaboradores Raphael Mansur Medina, Flávio Augusto Soares Graça, Renato Luiz Silveira, André Gimenes e Amanda Rocha

A amiga enfermeira Marília, pela eterna disposição em ajudar no que for necessário, as meninas do CBB, Adriana Alves Martins, Darli Grativol Keller e Rosimery Cardoso Maciel pelos ensinamentos , a amiga Zootecnista Fabiana pelas orientações na estatística, Luciana da Silva Mathias pelos fins de semana cuidando das culturas e a todos os outros amigos de trabalho que injustamente esquecerei de citar por toda a ajuda prestada durante todo esse tempo, pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração, pelos conselhos e por todo incentivo;

A UENF e ao Centro de Biociências e Biotecnologia por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este trabalho.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer
um novo recomeço, qualquer um pode recomeçar
e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

RESUMO

A causa mais comum de lesão da medula espinhal são os traumas de alto impacto, que frequentemente resultam em algum comprometimento motor, sensitivo ou autonômico em maior ou menor grau nas áreas distais ao nível do trauma. Em termos de sobrevivência e complicações devido a sequelas, os pacientes veterinários têm um prognóstico reservado a desfavorável. Portanto justifica-se o estudo de modelos experimentais de produção de lesão medular espinhal e posterior tratamento com terapia celular, que possam prover mais subsídios para pesquisa no âmbito clínico na medicina e medicina veterinária. Estudos pré-clínicos de lesão medular espinhal aguda requerem um modelo experimental animal reprodutível facilmente. O objetivo da tese foi avaliação do possível grau de regeneração neural e recuperação funcional de coelhos submetidos experimentalmente a lesão medular espinhal provocada pela técnica de compressão medular e tratados com células tronco mesenquimais ou células mononucleares derivadas de medula óssea, em diferentes tempos e por conseguinte comparar a terapia com estes dois tipos celulares, utilizando coelhos como modelo experimental por se tratar de uma espécie que apresenta um número menor de publicações conclusivas e que contempla os principais requisitos de um modelo como, baixo custo, praticidade de manejo, reprodutibilidade e uniformidade. Concluímos que o tratamento deste tipo de lesão com as terapias celulares propostas são benéficas na recuperação clínica dos animais.

Palavras – chave: compressão medular espinhal, paraplegia, cateter epidural.

ABSTRACT

The most common cause of spinal cord injury are high impact trauma, which often result in some motor impairment, sensory or autonomic a greater or lesser extent in the distal areas the level of trauma. In terms of survival and complications due to sequelae, veterinary patients have a poor prognosis unfavorable. Therefore justified the study of experimental production spinal cord injury and subsequent treatment with cell therapy, which can provide more support for research in the clinical setting in medicine and veterinary medicine. Preclinical studies of acute spinal cord injury require an experimental animal model easily reproducible. The purpose of these evaluation was possible degree of neural regeneration and functional recovery of experimental rabbits underwent spinal cord injury caused by spinal compression technique and treated with mesenchymal stem cells or the mononuclear cells derived from bone marrow, at different times and therefore compare therapy with these two cell types, using rabbits as an experimental model because it is a species that has fewer conclusive publications and contemplating the main requirements of a model as, low cost, management convenience, reproducibility and uniformity. We conclude that treatment of this type of injury with cellular therapies proposals are beneficial in clinical recovery of the animals

Key-words: spinal cord compression, paraplegia, epidural cateter.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Número de novos centros de terapia celular por estados estabelecidos após a criação da Comissão Nacional de Terapia Celular. Adaptado de Mendez-Otero et al., 2012..... **25**
- Figura 2.** Níveis da lesão medular e sistemas afetados. Fonte: <http://cienciasecognicao.org/neuroemdebate/?p=1983>..... **42**
- Figura 3.** Eventos fisiopatológicos após a lesão medular traumática. Os eventos estão divididos em fase imediata (2 horas), aguda (2 a 48 horas), subaguda (48 horas a 14 dias), intermediária (14 dias a 6 meses) e crônica (a partir de 6 meses). Adaptado de Siddiqui et al, 2014..... **50**
- Figura 4.** Fotografias mostrando o cateter de Fogarty com o balão inflável vazio (A) e cheio (B)..... **61**
- Figura 5.** Coluna vertebral de coelho. Laminectomia dorsal do processo espinhoso de L3, seta preta (A); Introdução do cateter no canal medular, seta amarela (B). Fonte: Arquivo pessoal, 2014..... **62**
- Figura 6.** Imagens tomográficas em plano axial de um Coelho demonstrando o posicionamento do cateter de Fogarty dentro do canal medular. (A) Imagem da inserção do cateter (seta) na vertebra L3. (B and C) Imagens demonstrando o posicionamento do cateter (seta) em deslocamento cranial. (D) Imagem demonstrando o balonete insuflado (seta) dentro da vertebra. Notar que o volume do balonete insuflado ocupa parte significativa do canal medular promovendo compressão do cordão medular. Fonte: Arquivo pessoal, 2014..... **63**
- Figura 7.** Agulha de Biópsia de Medula Óssea Tipo Jamshidi. Fonte: <http://www.hospiline.com.br/DetalhesProduto.aspx?id=2>..... **64**

- Figura 8.** Foto do frasco contendo a Fração de Células Mononucleares da Medula Óssea (MNMOs) após centrifugação e isolamento por gradiente de densidade com Histopaque. As MNMOs se encontram indicadas com a seta, entre o DMEM F12 e Histopaque 1083. Fonte: Coelho B. P, 2014..... **65**
- Figura 9.** Imagem do cultivo de células mesenquimais em confluência. Fonte: Arquivo pessoal, 2014..... **66**
- Figura 10.** Fotomicrografia de medula espinhal torácica de coelho. **(A)** Numerosos macrófagos espumosos (células Gitter) fagocitando lípidos provenientes da mielomalácia (*). H/E, obj. 10X. **(B)** Ampliação da imagem anterior onde podem ser evidenciados os macrófagos espumosos associados a mielomalácia (setas). H/E, objetiva 20X. Fonte: Arquivo pessoal, 2014..... **73**
- Figura 11.** Fotomicrografia de medula espinhal lombar de coelho. **(A)** Observam-se macrófagos no interior do canal espinhal (*). H/E, obj. 20X. **(B)** Ampliação da imagem anterior onde podem ser observados macrófagos contendo hemossiderina em seu citoplasma (setas). H/E, obj. 40X. Fonte: arquivo pessoal, 2014..... **74**
- Figura 12.** Fotomicrografia de medula espinhal lombar de coelho. **(A)** Mineralização de meninge acentuadamente espessada (*). H/E, obj. 10X. **(B)** Aumento da imagem anterior onde pode ser observado a mineralização (seta) a fibrose da meninge (*) e numerosos macrófagos espumosos (■). H/E, obj. 20X. Fonte: arquivo pessoal, 2014..... **74**
- Figura 13.** Fotomicrografia de medula espinhal sacral de coelho. **(A)** Infiltrado inflamatório mononuclear ao redor de vaso sanguíneo (seta). H/E, obj. 10X. **(B)** Ampliação da imagem anterior onde podem ser vistos numerosos linfócitos ao redor de um capilar (manguito perivascular) (seta). H/E, obj. 20X. Fonte: arquivo pessoal, 2014..... **75**

Figura 14. Fotomicrografia de medula espinhal sacral de coelho. **(A)** Observa-se acentuada fibrose das meninges (*) e numerosos macrófagos espumosos (■). H/E, obj. 10X. **(B)** Ampliação da imagem anterior onde podem ser observados numerosos fibroblastos permeados por moderada quantidade de matriz colagenosa (*) e macrófagos espumosos (■). H/E, obj. 20X. Fonte: arquivo pessoal, 2014..... **75**

Figura 15. Fotomicrografia de medula espinhal lombar de coelho. **(A)** Observam-se numerosos neurônios demonstrando cromatólise central (setas). H/E, obj. 10X. Ampliação da imagem anterior onde pode ser observado cromatólise central e núcleo periférico (seta) (comparar com neurônio normal em imagem superior a direita). H/E, obj. 20X. Fonte: arquivo pessoal, 2014..... **76**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Análise estatística das avaliações dos vídeos.....	72
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de avaliação motora e sensitiva dos membros pélvicos.....	68
--	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 JUSTIFICATIVA	20
1.2 OBJETIVO	21
1.2.1 Objetivos gerais	21
1.2.2 Objetivos específicos	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 HISTÓRICO	22
2.2 CÉLULAS-TRONCO.....	29
2.2.1 Conceitos e classificação	29
2.2.2 Células derivadas de medula óssea	32
2.2.2.1 Células mononucleares.....	34
2.2.2.2 Células-tronco mesenquimais.....	36
2.2.3 Células-tronco de tecidos diversos	38
2.3 MEDULA ESPINHAL.....	41
2.3.1 Tratos medulares	43
2.3.2 Discos intervertebrais	44
2.4 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO MEDULAR AGUDA.....	45
2.4.1 Efeito imediato do trauma a nível celular	50
2.4.2 Alterações vasculares	51
2.4.3 Principais eventos bioquímicos	52
2.4.4 Reação inflamatória	53
2.5 TERAPIA CELULAR.....	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 DELINEAMENTO	59
3.2 ANIMAIS	59
3.3 LOCAL DO EXPERIMENTO.....	60
3.4 PROTOCOLO ANESTÉSICO E PÓS ANESTÉSICO.....	60
3.5 MODELO DE LESÃO MEDULAR	61
3.6 PROTOCOLO DE COLETA, PROCESSAMENTO E OBTEÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES E MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA.....	64

3.7 PROTOCOLO DE TERAPIA CELULAR.....	67
3.8 CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO MOTORA E SENSITIVA	67
3.9 SACRIFÍCIO	68
3.10 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	68
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5. RESULTADOS	71
5.1 AVALIAÇÃO SENSORIAL E MOTORA.....	71
5.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	72
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÕES	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXO	102

1 INTRODUÇÃO

Lesões da medula espinhal frequentemente resultam em algum comprometimento motor e sensitivo em maior ou menor grau. Muitos estudos indicam que o transplante de diferentes tipos de células tronco, podem promover uma recuperação funcional em animais submetidos a modelos experimentais de lesão de medula espinhal. O potencial terapêutico das células-tronco (CT), é extremamente diverso e portanto, sua possibilidade de aplicação em enfermidades ou lesões também é bastante variável, inclusive em termos de resultados (BOTELHO, 2009).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde em 2013, 500.000 pessoas ao ano no mundo sofrem lesões medulares espinhais e tem uma perspectivas de morte prematura 2 a 5 vezes maior que o restante da população. Em seres humanos a causa mais comum de lesão da medula espinhal são de origem traumática (90%) provenientes de acidentes de tráfego, quedas, violência e atividades desportivas, e a maioria dos pacientes são jovens e adultos jovens. (WHO, 2013).

Na medicina veterinária não temos uma estatística nacional ou mundial quanto ao número anual de animais de companhia que sofrem lesão da medula espinhal, contudo a causa mais comum é a mesma dos humanos ou seja o trauma, e a faixa etária também é bastante ampla. Em termos de sobrevivência e complicações devido a sequelas, os pacientes veterinários tem uma perspectiva pior, seja pela demora ou falta do atendimento veterinário adequado, seja pela comodidade do proprietário em poder optar pela eutanásia nos casos em que ocorrem paraplegias ou tetraplegias decorrentes do trauma medular.

As terapias farmacológicas, intervencionistas e cirúrgicas convencionais para lesões de medula espinhal, visam a estabilização e manutenção do paciente tendo no entanto ínfima capacidade de regeneração neuronal. Uma terapia ideal deveria minimizar as perdas funcionais, melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida dos pacientes com lesão medular espinhal. A terapia celular surge, hipoteticamente, como uma alternativa para promovermos , se não a cura, uma melhora significativa do nosso paciente, e uma vez que o melhor conhecimento das técnicas de terapia com transplante de células tronco provenientes de medula óssea como as

1 mononucleares e mesenquimais mostram-se economicamente viáveis, o êxito no
2 domínio e aplicação clínica destas técnicas pode nortear o futuro da terapia de lesão
3 medular espinhal de forma relevante não só na medicina veterinária como na
4 humana.(FRISÉN, 2008).

5 A terapia celular inclui um conjunto de técnicas que visam a utilização de células
6 tronco com uma finalidade terapêutica, e os modelos animais em ensaios pré-clínicos
7 são fundamentais para o desenvolvimento deste tipo de terapia em diversas afecções
8 e sinalizam para uma possível extrapolação dos achados para estudos em humanos.
9 No entanto apesar da grande diversidade de trabalhos existentes, há alguma
10 dificuldade na comparação direta desses dados, devido ao grau variável de
11 caracterização das células transplantadas, diferentes modelos animais e a variação
12 do tempo entre a ocorrência da lesão e o tratamento (BARNABÉ– HEIDEN, 2008).

13 As células-tronco são células indiferenciadas que possuem propriedades
14 peculiares como a capacidade prolongada ou ilimitada de multiplicação através de
15 sucessivas mitoses, podendo se dividir em células idênticas a elas, ou seja, com o
16 mesmo potencial de autorrenovação ou dar origem a células especializadas
17 (VERFAILLIE, 2002). A classificação destas células é proposta de maneira
18 diversificada por muitos autores no mundo todo, sendo entretanto uma descrição
19 clara, objetiva e uma das mais utilizadas, aquela que propõem a subdivisão a partir
20 de dois critérios: segundo o grau de potencialidade ou de acordo com o tipo de tecido
21 de onde se originam, o que detalharemos mais adiante.

22 De acordo com a Internacional Society for Stem Cells Research existem
23 diferentes tipos de células tronco oriundas de diferentes tecidos corporais em
24 diferentes períodos da vida. As células tronco embrionárias são aquelas presentes
25 somente nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e vários outros tipos
26 de células tronco denominadas de adultas ou tecido específicas aparecem durante o
27 desenvolvimento fetal e permanecem no nosso corpo ao longo da vida. Mais
28 recentemente os cientistas incluíram na classificação das células tronco, as
29 denominadas células tronco de pluripotência induzida produzidas em laboratório.
30 Essas células são produtos da engenharia genética que é capaz de levá-las a terem
31 propriedades similares as células tronco embrionárias. Vários avanços têm ocorrido
32 recentemente em pesquisas de células cultivadas e induzidas à diferenciação por

1 vários métodos, porém ainda há muitos questionamentos a serem respondidos
2 (MINGRONI-NETTO; DESSEN, 2006).

3 A proposta deste experimento é demonstrar a viabilidade da utilização do
4 implante da fração de células mononucleares e de células tronco mesenquimais
5 oriundas da medula óssea, como terapia de coelhos submetidos a processo de lesão
6 medular espinhal aguda induzida através da introdução cirúrgica e insuflação de
7 cateter de Fogarty na região lombar do conduto vertebral causando paraplegia.

8 A hipótese é que a terapia celular represente uma alternativa viável para o
9 tratamento da lesão medular espinhal melhorando a reestruturação do tecido nervoso
10 e as funções sensitiva e motora dos animais.

11

12 **1.1 JUSTIFICATIVA**

13

14 As lesões medulares espinhais acometem milhares de pessoas e animais todos
15 os anos e invariavelmente deixam diversos tipos sequelas incapacitantes em que
16 tratamentos para recuperação funcional são extremamente limitados em termos de
17 resultados positivos, necessitamos portanto lançar mão de todo recurso terapêutico
18 disponível, sempre respeitando os princípios éticos, e transferindo as técnicas para
19 estudos pré-clínicos e clínicos controlados e finalmente consagrarmos procedimentos
20 para uso corrente. Se assim o fizermos obteremos avanços significativos no
21 tratamento das lesões de medula espinhal em diferentes espécies e ainda poderemos
22 fornecer subsídios para as pesquisas em medicina humana, já que modelos animais,
23 tem mostrado boa eficácia terapêutica (QUARTO et al., 2001). O real potencial da
24 Terapia Celular ainda está longe de ser conhecido por completo e encontra-se em
25 pleno desenvolvimento, mas já é uma realidade especialmente em afecções do
26 aparelho locomotor de humanos e animais, principalmente na hipiatria, onde centenas
27 de pesquisas já foram realizadas, publicadas e hoje fazem parte da rotina médica.
28 Particularmente o transplante de células tronco extraídas de medula óssea são as que
29 mais possibilitam utilização na prática clínica e não só para fins de pesquisa, sendo,
30 portanto justificável que investiguemos mais, para aprimorarmos nossos
31 conhecimentos a cerca do tema.

1 1.2 OBJETIVOS

2

3 1.2.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Avaliação do possível grau de regeneração neural e recuperação funcional de
6 coelhos submetidos experimentalmente a lesão medular espinhal provocada pela
7 técnica de compressão medular e tratados com células tronco mesenquimais
8 mononucleares derivadas de medula óssea, em diferentes tempos e por conseguinte
9 comparar a terapia com estes dois tipos celulares .

10

11 1.2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS:

12

- 13 1. Avaliar através de análise histopatológica os graus de lesão e recuperação
14 da medula espinhal.
- 15 2. Avaliar através de vídeos a evolução clínica sensorial e motora dos animais
16 submetidos a terapia celular com células tronco mononucleares e
17 mesenquimais em tempos pós-cirúrgicos distintos e observar a variação
18 entre essas terapias.
- 19 3. Avaliar a viabilidade e segurança de um ensaio pré-clínico de terapia celular
20 em coelhos utilizando a técnica de indução de lesão medular espinhal
21 através da insuflação de cateter no canal vertebral.

22

23

24

25

26

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Durante muito tempo a medicina considerou a medula espinhal como um mero tubo que conectava o cérebro aos diferentes órgãos e estruturas do corpo. Esta visão simplista foi modificada graças a brilhante contribuição de Sir Charles S. Sherrington, cuja famosa monografia intitulada " A Ação Integrativa do Sistema Nervoso" explica a organização do sistema nervoso central. Com esta monografia, Sherrington estabeleceu um longo debate entre "A Teoria Reticular", a qual discuti a contiguidade física dos neurônios, e a "Doutrina Neuronal", que sugere que a comunicação entre cada neurônio ocorre através de sinapse (BURKE, 2007).

O National Spinal Cord Injury Statistical Center (Nscisc, 2013) estima que 273.000 pessoas vivem com lesões medulares apenas nos Estados Unidos, aos quais se somam 12.000 novos casos/ano sendo as maiores causas dessas lesões primeiramente acidentes de transito (41,7%) seguida de quedas (27,3%), violência (15%) e esportes com (7,8%). Na mesma perspectiva, porém com dados epidemiológicos escassos, o Brasil apresentava em 2003, 250.000 lesados medulares com 9.000 novos casos/ano, de acordo com Meyer e colaboradores (2003). A prevalência mundial é de 236 a 1298/por milhão de habitantes e é mais frequente no sexo masculino, na faixa etária entre 30 e 40 anos de idade, no entanto, a proporção de mulheres afetadas por lesões medulares vem crescendo (FURLAN et al., 2013).

O número de pessoas acometidas por lesão medular espinhal gira em torno de 500.000 pessoas ao ano no mundo que tem uma perspectiva de morte prematura 2 a 5 vezes maior que o restante da população (WHO, 2013).

O primeiro registro documentado de lesão medular é de um papiro de 2500 a.C. adquirido pelo egiptologista Edwin Smith, em 1862, e traduzido por James Henry Breasted em 1930, no qual relata-se que a lesão medular é "um mal a não ser tratado" (VAN MIDDENDORP et al., 2010)

1 O primeiro relato experimental foi de Schmaus, em 1890, que observou
2 degeneração e cavitação nas medulas espinhais de coelhos após lesões medulares,
3 e, em 1900, Bikeles confirmou os mesmos relatos. Kirchgasses e Scagliosi (1897 e
4 1898, respectivamente) relataram que danos na medula espinhal causavam
5 degeneração da mielina, hemorragia intra-parenquimal e morte celular no dorso
6 anterior da medula espinhal (YEO, 1976).

7 Ao final da década de 1920, Ferraro observou em coelhos que após o trauma
8 medular havia um edema acentuado dos axônios na primeira hora do trauma,
9 alterações da mielina dentre as primeiras 12 horas e degeneração da substância
10 branca com início de um processo de gliose já em 4 dias após a lesão medular (YEO,
11 1976).

12 Com relação a idealização de técnicas para desenvolver a lesão medular
13 espinhal experimentalmente de forma economicamente viável, segura, reprodutível, e
14 respeitando as exigências da bioética, houve um esforço da comunidade científica que
15 estuda lesão medular ao longo dos anos, em padronizar modelos para melhor
16 compreender os processos fisiopatológicos envolvidos após o trauma da medula.
17 Assim, Alfred R. Allen, em 1911, desenvolveu o primeiro aparato de contusão da
18 medula, aparelho o qual derrubava um peso específico e calibrado perpendicular à
19 região torácica de cachorros. Atualmente, há vários modelos de contusão: *Ohio State*
20 *University (OSU) impactor*; *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS)*
21 *Impactor*; *NYU Weight-Drop Device* (DUNHAM; FLOYD, 2011). No entanto, em 1971
22 Tator desenvolveu o modelo de clipe vascular para estudar lesões medulares em
23 macacos e roedores através da compressão medular. Modelos de transecção total da
24 medula, apesar de existirem, são pouco utilizados por não mimetizarem o que
25 geralmente ocorre em humanos e, dessa forma, não possibilitam a translacionalidade
26 dos estudos. Por outro lado, hemiseção da medula espinhal tem sido um modelo
27 utilizado para facilitar a compreensão de eventos moleculares, principalmente
28 regeneração axonal, que ocorrem após o trauma (WILLIS, 2002). Em 2001, Vanicky
29 desenvolveu um modelo de compressão medular por catéter de Fogarty, modelo que
30 utilizamos nesta referida tese com algumas modificações (VANICKY et al., 2001).

31 A possibilidade da renovação tecidual a partir da resposta do próprio organismo
32 afetado transcende a própria realidade. Foi vislumbrada poeticamente na arte da

1 mitologia grega através do Mito de Prometeu segundo Hesíodo, importante poeta
2 grego no século VII a.C. (FAGOT-LARGEAULT, 2004).

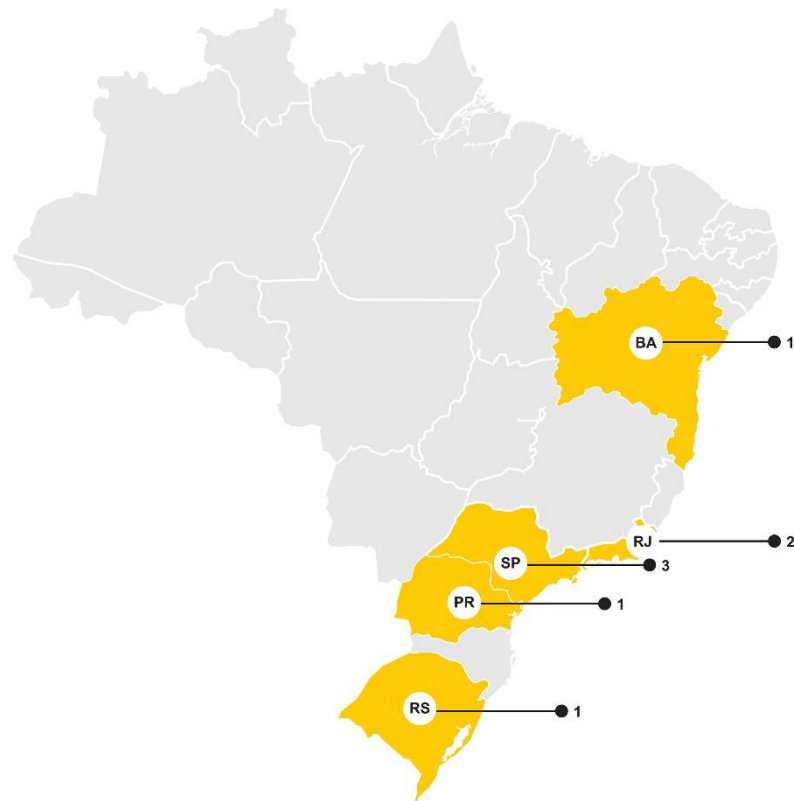
3 A terapia celular moderna *sensu strictum*, na prática não é uma forma nova de
4 tratamento. Se remontarmos ao passado a terapia celular teve o seu início séculos
5 atrás desde quando se pretendeu utilizar sangue humano ou de animais para repor
6 perdas de volumes de sangue. Na prática isto se concretizou com a descoberta dos
7 grupos sanguíneos, inicialmente o ABO em 1900, e posteriormente o Rh, que
8 propiciou a seleção do sangue de doadores e determinou de forma médica e científica
9 a reposição sanguínea, criando uma nova área de conhecimento. As células utilizadas
10 nesta reposição eram os glóbulos vermelhos que agora por serem compatíveis a
11 aqueles sistemas de grupos sanguíneos passaram a ser tolerados e aceitos
12 (VOLTARELLI et al., 2009). Com esta tecnologia as cirurgias passaram a ser cada
13 vez mais complexas e audaciosas, pois as perdas sanguíneas eram repostas de forma
14 imediata fazendo com que as transfusões de sangue ou dos componentes do sangue
15 sejam uma forma de terapia celular que denominamos de terapia celular de reposição
16 (RUIZ, 2013).

17 O histórico do transplante de medula óssea está diretamente relacionado a
18 evolução da terapia celular, desde os estudos iniciais até o seu reconhecimento em
19 1990 com o Prêmio Nobel de medicina agraciado ao Dr. E. Donnall Thomas
20 (THOMAS, 2000).

21 Como descreve Cortes (2011), no final da década de 90, o determinismo que
22 predominava nos conhecimentos sobre a biologia celular, foi transposto, órgãos em
23 que se acreditava que não possuíam células tronco ou células passíveis de regenerar
24 tecidos lesados ou envelhecidos foram descritos, e os estudos com células tronco
25 embrionárias fizeram com que *in vitro*, fossem desenvolvidas várias linhagens de
26 células e *in vivo* fosse observado resultados surpreendentes de regeneração em
27 várias doenças.

28 No Brasil após 2005 recursos governamentais começaram a ser alocados para
29 projetos de pesquisa e a rede nacional de terapia celular foi criada como resultado da
30 formação de vários centros de terapia celular (Figura 1). O investimento do governo
31 brasileiro na área de terapia celular é demonstrado na tabela 1, (MENDEZ-OTERO et
32 al.,2012).

1



2

3 **Figura 1.** Número de novos centros de terapia celular por estados estabelecidos após
 4 a criação da Comissão Nacional de Terapia Celular. Adaptado de Mendez-Otero et
 5 al., 2012.

6

7 O esquema a seguir demonstra de forma cronológica alguns dos eventos mais
 8 relevantes da pesquisa de células tronco e terapia celular.

9

ANO	EVENTO
1938	- Idéia da clonagem. Hans Spermann - proposta de transferência do núcleo de uma célula em estágio tardio de desenvolvimento para um óvulo.
1945	- Os estudos experimentais com CT iniciaram-se após a exposição de populações civis a doses letais de radiação produzidas pelas bombas atômicas.

1956 – Para reproduzir os efeitos causados pela radiação, começaram a ser feitos experimentos com camundongos irradiados e, em 1956, alguns grupos mostraram que o transplante de MO corrigia, nestes animais, os efeitos da radiação.

1957 – Foi realizado o primeiro transplante de CT de MO em humanos entre dois irmãos gêmeos univitelinos para o tratamento de leucemia.

1960 – Nesta década foi confirmada a presença de células precursoras não-hematopoiéticas na MO.

1960 – Foi também nesta década que foram isoladas células de caráter pluripotente e com potencial ilimitado de divisão, encontradas em tumores de gônadas de camundongos.

1960 – Observou-se a neurogênese em adultos, desmentindo a idéia inicial de que o tecido nervoso não promovia a renovação celular.

1961 – Evidenciou-se a existência de células precursoras na MO capazes de gerar colônias de múltiplas linhagens hematopoiéticas no baço. A partir daí, foram descobertas as células-tronco hematopoiéticas (CTH) que dão origem as células do sangue e do sistema imunológico.

1963 – Fica comprovado o potencial de autorrenovação das CT provenientes da MO.

1980 – Nos anos oitenta identificou-se o sangue do cordão umbilical e da placenta dos recém natos como uma fonte rica em CT.

1981 – Foram desenvolvidas técnicas de extração de CT de embriões de camundongo. É criado o termo “embryonic stem cell” – células-tronco embrionárias (CTE). 1981: Pesquisadores da Universidade de Genebra (Suíça) – clones de ratos a partir de células embrionárias.

1986 – CTH foram identificadas com a utilização de anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície. Estes marcadores foram encontrados em algumas, mas não em todas as CTH e, através da combinação de

marcadores positivos e negativos, foram separadas as células com atividade de precursores.

1989 – No final da década de 80, CTE geneticamente alteradas passaram a ser reintroduzidas em embriões de camundongos e, assim, incorporadas a eles. Essa combinação entre a manipulação genética e o uso das CTE tornou possível a obtenção de modelos de estudos para diversas doenças humanas.

1996 – Foram isoladas CTE a partir de blastocistos de macacos. 1996: Surgiu a Dolly, que teve seu nascimento anunciado em 1997, tornando-se um marco na Era Biotecnológica.

1998 – A primeira descoberta da capacidade das CT de MO de se diferenciarem em células mais especializadas.

1998 – Isolamento da primeira linhagem de CTE humanas por pesquisadores americanos. Estas células foram derivadas de embriões em fase de blastocisto, excedentes da fertilização *in vitro*. Este é considerado um verdadeiro marco na história das pesquisas com CT.

1999 – Em janeiro de 1999 foi demonstrado a pluripotencialidade das CTM.

2002 - No início de 2002, foi publicado na revista *Proceedings of the National Academy of Sciences*, o transplante bem-sucedido de células progenitoras embrionárias que se diferenciaram em células nervosas dopaminérgicas em um modelo animal com doença de Parkinson

2004 – No dia 08 de outubro foi realizado o primeiro transplante de MO com células coletadas de cordão umbilical coletado, congeladas e disponibilizadas no Brasil.

2005 – Em março desse ano, foi sancionada, pelo Governo Federal, a Lei de Biossegurança, número 11.105/05, que permite que embriões congelados há mais de três anos sejam utilizados para pesquisas, desde que os pais consistam nessa doação.

2005 – Grupo de pesquisas coreano afirmou ter conseguido realizar a primeira clonagem terapêutica humana da história, obtendo onze linhagens

de CTE a partir da transferência nuclear de células do paciente para óvulos doados.

2006 – Foi descoberto que os resultados obtidos no estudo relatado acima (clonagem terapêutica), eram **fraudados**, alertando a todos para a avaliação mais criteriosa dos trabalhos científicos divulgados.

2006 – A Inglaterra foi o primeiro país europeu a liberar as pesquisas com CTE humanas, seguida pela Finlândia, Grécia, Holanda e Suíça.

2007 – Pesquisadores da Universidade de Kyoto no Japão, obtiveram CT com caráter pluripotente sem a utilização de embriões, por meio da reprogramação de fibroblastos retirados da pele de camundongos.

2007 – Em junho desse mesmo ano, foi anunciado a obtenção de CTE de primatas utilizando as técnicas da clonagem terapêutica.

2008 – Em janeiro, cientistas norte-americanos do Centro de Tecnologia Celular Avançada, anunciaram a produção de CTE sem a necessidade de destruir o embrião; o método em geral não prejudica o embrião, que é congelado e supostamente pode ser utilizado em um futuro processo de fertilização.

2008 – Grupo de pesquisadores da Universidade de São Paulo juntamente ao Instituto de Ciências Biomédicas do Rio de Janeiro, conseguiram isolar a primeira linhagem de CTE humanas com tecnologia 100% nacional. Feito importante para a autonomia no avanço das pesquisas com CT no Brasil.

2009-2010 – Incremento das pesquisas sobre a obtenção de CT em tecidos diferenciados como polpa dentária e tecido adiposo onde se observou uma concentração de células multipotentes superior ao da MO

2011-2012 – A associação da terapia celular a terapia genética, como ocorre com a Distrofia Muscular de Duchenne desde 2008, tem sido a grande novidade no desenvolvimento de novas pesquisas em busca de cura para doença de origem gênica.

2013-2015 – As áreas e os temas mais abordados nos últimos tempos relativos a terapia celular são medicina regenerativa e terapia génica associada a células tronco e termos como medicina regenerativa, bioengenharia, scaffolds, células tronco de pluripotencia induzida estão em voga

1

2

3 **2.2 CÉLULAS-TRONCO**

4

5 **2.2.1 CONCEITOS E CLASSIFICAÇÃO**

6

7 As CT são células indiferenciadas com potencial ilimitado de proliferação e
8 autorrenovação, que podem ser classificadas quanto a sua origem em embrionária,
9 fetal ou adulta (YU et al., 2009; BROUGHTON et al., 2013).

10 O termo CT, do inglês *stem cell*, diz respeito a células precursoras que
11 possuem a capacidade de diferenciação e auto renovação ilimitadas, podendo dar
12 origem a uma variedade de tipos teciduais tais como osso, tendões, cardiomiócitos,
13 tecido adiposo, muscular, neuronal, entre outros (WATT; HOGAN, 2000; BERNÁ,
14 2001; ODORICO et al., 2001; GRITTI et al., 2002).

15 A classificação das CT é proposta de maneira diversificada por muitos autores
16 no mundo todo, a mais utilizada é aquela que classifica as CT de acordo com a sua
17 potencialidade e do tipo de tecido do qual ela se origina (WATT; HOGAN, 2000)

18 O grau de potencialidade é a capacidade que a célula tem de gerar diferentes
19 linhagens celulares, podendo ser:

- 20 • **Totipotentes:** células que, quando isoladas, são capazes de gerar por si só
21 outro indivíduo completo, incluindo os tecidos placentários. Ex: células
22 embrionárias na fase de mórula, quando o embrião é composto de 8 a 16
23 células.

- 1 • **Pluripotentes:** capazes de se diferenciar em todos os tecidos do corpo
2 humano, exceto nos anexos embrionário, ou seja, podem dar origem a
3 linhagens dos 216 diferentes tipos de tecidos que formam o corpo humano. Ex:
4 células embrionárias na fase de blastocisto, com 72h. As células tronco
5 pluripotentes são as únicas capazes de se diferenciarem *in vitro*, de modo
6 inerente e espontâneo, em células das três linhagens germinativas. Elas se
7 caracterizam por apresentarem alta capacidade de proliferação, morfologia
8 típica, expressão de marcadores específicos (ex. SSEA-3, SSEA-4, OCT-4,
9 SOX-2, NANOG, KLF4) e capacidade de formação de teratomas.

- 10 • **Multipotentes:** possuem potencial de diferenciação mais restrito, limitado a
11 apenas alguns tipos celulares. É encontrada em estágios posteriores do
12 desenvolvimento fetal e que persistem após o nascimento. Também chamadas
13 de células-tronco adultas. Ex: células da medula óssea (MO), do cordão
14 umbilical e as células-tronco de tecido endotelial, adiposo, dentário, etc.

- 15 • **Oligopotentes:** que se diferenciam em poucas células de um mesmo folheto
16 embrionário.

- 17 • **Unipotentes:** capazes de gerar só um tipo de célula, responsáveis pela
18 regeneração de tecidos particulares. Exemplo: células da camada germinativa
19 da epiderme, eritroblastos, células do fundo das criptas de Liberkham no
20 duodeno, espermatogônicas no testículo, etc.

21 Quando classificadas do ponto de vista morfológico, de origem, são
22 denominadas: Embrionárias, que são totipotentes ou então Células tronco adultas ou
23 somáticas, sendo pluripotentes (BOCCHI; FERREIRA, 2005; MOZID et al., 2011)

- 24 • **Embrionárias:** como o próprio nome diz, são aquelas isoladas do embrião.
25 Elas constituem a massa celular interna do blastocisto. O que estabelece seu
26 potencial de diferenciação é a fase em que se encontra o embrião quando as
27 células são isoladas. Por isso, quanto mais jovem o embrião, mais
28 indiferenciadas serão suas células.

- 29 • **Adultas ou Somáticas:** são células multipotentes encontradas na MO,
30 sangue de cordão umbilical, sangue periférico, polpa dentária, alguns órgãos

1 (ex. pâncreas e fígado) e diversos outros tecidos do corpo humano (ex. tecido
2 adiposo, pele, etc.).

3 Células tronco adultas (CTA) estão presentes em todos os tecidos do
4 organismo, incluindo o tecido nervoso, as quais têm a função de repor as células
5 lesionadas ou que se degeneram durante a vida do indivíduo. Nos tecidos, essas
6 células estão, localizadas em sítios específicos, chamados “nichos”, que são
7 diferentes para cada tipo de tecido, porém geralmente se encontram aderidos à
8 membrana basal em áreas protegidas (CHA; FALANGA, 2007).

9 Os fatores circunjacentes as células tronco (fatores internos e externos) são
10 extremamente importantes para a sua manutenção, isto é, autorrenovação e
11 diferenciação celular. Esse microambiente complexo e dinâmico, que transmite e
12 recebe os sinais por meio de mediadores celulares e não celulares, e denominado
13 nicho (JONES; WAGERS, 2008). Até o momento, os cientistas desconhecem os
14 mecanismos que estabelecem os nichos.

15 O uso potencial das células tronco embrionárias (pluripotentes) para certas
16 doenças e terapias celulares é enorme, porém, envolve diversas questões éticas,
17 principalmente em relação ao embrião humano, e seu uso tem sido associado com a
18 formação de tumores (WAKITANI et al., 2003), mais especificamente, o teratoma.
19 Também há evidência da indução de tumores (sarcoma) pelas células-tronco
20 mesenquimais implantadas junto de *bioscaffold* em camundongo (TASSO et al., 2009;
21 XIE et al., 2011), por isso é necessário um maior número de investigações à fim de
22 evitar essa ocorrência. O fato de a célula-tronco adulta ou do cordão umbilical
23 poderem causar a formação de teratomas, ou outros tipos de tecidos indesejados é
24 pouco estudado, entretanto esta possibilidade deve ser considerada caso seja
25 utilizada a terapia com células-tronco (KOCH et al., 2009; SOUZA, 2010).

26 As células tronco adultas podem manifestar uma resposta regenerativa através
27 da diferenciação em células maduras no tecido nas quais essas foram implantadas e
28 produzindo um tecido apropriado de matriz extracelular (MEC). Elas também
29 contribuem na cicatrização através da produção de proteínas bioativas (fatores de
30 crescimento e citocinas) que exerce um efeito de sinalização local através do
31 recrutamento das células-tronco endógenas e induzindo efeitos anabólicos nas
32 células recém recrutadas e nas células maduras tecido-específico já presentes no

1 tecido. O potencial de diferenciação celular, produção de fatores de crescimento, e o
2 recrutamento celular têm feito da tecnologia das células-tronco um dos tópicos mais
3 discutidos da atualidade (DAHLGREN, 2008).

4 Recentemente foram desenvolvidas as células-tronco de pluripotência induzida
5 (IPs, na sigla em inglês), que são células do organismo adulto que foram
6 reprogramadas geneticamente para se comportar como células pluripotentes,
7 idênticas às células tronco embrionárias, com capacidade para se transformar em todo
8 tipo de tecido. A técnica consiste na reprogramação das células adultas usando um
9 vírus ou plasmídeo, como cavalo-de-tróia, para inserir nas células adultas quatro
10 fragmentos de DNA capazes de ativar genes normalmente funcionais em células-
11 embrionárias (GUIMARÃES, 2009). Com objetivo de melhorar a plasticidade das
12 células tronco adultas, pesquisadores conseguiram ampliar o potencial de
13 diferenciação dessas células, por meio de: a) transferência nuclear somática e b)
14 reprogramação genética de células somáticas ao estado embrionário, mediante a
15 introdução de genes determinantes de pluripotência (OCT-4, SOX-2, KLF-4, cMYC).
16 Essas células são então denominadas células tronco pluripotentes induzidas ou *IPs*
17 *cells* (NISHIKAWA; GOLDSTEIN, 2009).

18

19 **2.2.2 CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA**

20

21 A medula óssea (MO) é um tecido esponjoso que preenche o interior dos ossos
22 longos presentes em nosso organismo e é o local de produção de todos os
23 componentes do sangue e do sistema imunológico, quando estes precisam ser
24 repostos (FREITAS, 2005).

25 As células tronco derivadas da medula óssea (MO) tem origem mesenquimal
26 e, durante o período de vida intra-uterino, está presente no saco vitelino embrionário
27 e, posteriormente, desloca-se por via hematogênica para o fígado, baço, linfonodos e
28 timo fetal. Na metade do período de vida intra-uterino, a hematopoese passa a ocorrer
29 na medula óssea, que se torna o principal sítio hematopoético no final da gestação
30 até a vida adulta. As células tronco hematopoiéticas (CTH) são as únicas células do
31 sistema hematopoético que exibem potencial proliferativo extensivo e capacidade de

1 se diferenciar em todas as células do sistema linfohematopoético continuamente até
2 a morte (GASPER; THRALL, 2000; HERZOG et al., 2003). A maioria das CTH está
3 na fase de repouso (**G0**) do ciclo celular e há pouca atividade mitótica no
4 compartimento das células-tronco, no qual ocorre a autorrenovação das referidas
5 células e a manutenção da hematopoese pela proliferação clônica. Morfologicamente,
6 as CTH assemelham-se aos pequenos linfócitos, tendo alta razão núcleo-citoplasma,
7 nucléolo proeminente e citoplasma basofílico destituído de grânulos (GASPER;
8 THRALL, 2000). Estudos recentes em humanos têm revelado a plasticidade das
9 células-tronco hematopoéticas, que podem se diferenciar em células não
10 hematopoéticas de vários tecidos, incluindo células do fígado, sistema nervoso
11 central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrintestinal, coração e músculo
12 esquelético (ALISON et al., 2000).

13 Dentre as células-tronco adultas, as células de medula óssea são as que vêm
14 sendo mais utilizadas, tanto em estudos pré-clínicos, como nos estudos clínicos em
15 andamento (MENDEZ-OTERO et al., 2009).

16 A medula óssea é uma fonte permanente de células-tronco pluripotentes, que
17 podem originar não somente linhagens celulares hematogênicas e mesenquimais,
18 mas também células de vasos sanguíneos (KÖRBLING; ESTROV, 2003). Os
19 resultados de diversos estudos pré-clínicos demonstram que células-tronco derivadas
20 de medula óssea apresentam um efeito benéfico na recuperação funcional de animais
21 isquêmicos (IIHOSHI et al., 2004; GIRALDI-GUIMARÃES et al., 2009; BRENNEMAN
22 et al., 2010; WAGNER et al., 2012; SAMPAIO et al., 2013; COELHO; GIRALDI-
23 GUIMARÃES, 2014).

24 Estas células têm sido utilizadas logo após a retirada da medula (a denominada
25 fração mononuclear) ou após diversas etapas de expansão em cultura (células
26 mesenquimais de medula óssea). A vantagem da utilização das células-tronco
27 derivadas da medula óssea em relação a outros tipos é a possibilidade de terapia
28 celular com células retiradas da medula óssea do próprio paciente, o que elimina todas
29 as questões éticas e de disponibilidade (MENDEZ-OTERO et al., 2009).

30 A capacidade dessas células de serem quimioatraídas para os tecidos
31 lesionados e de liberarem citocinas e fatores tróficos, direta ou indiretamente, parecem
32 ser os mecanismos predominantes responsáveis pelos efeitos positivos sobre a

1 recuperação do sistema nervoso (KRAUSE et al., 2001; CHOPP ; LI, 2002; CRAIN et
2 al., 2005; ZHANG et al., 2013). Desta forma, estes fatores possivelmente resultam em
3 aumento da angiogênese, neurogênese e sinaptogênese, e diminuição da inflamação,
4 com conseqüente aumento no remodelamento do sistema nervoso e melhora
5 funcional (MALGIERI et al., 2010; BORLONGAN et al., 2011; HAO et al., 2014).

7 **2.2.2.1 CÉLULAS MONONUCLEARES**

8
9 Dentre as células-tronco derivadas de medula óssea, um protocolo que vem
10 sendo bastante estudado é o da terapia com as Células Mononucleares de Medula
11 Óssea (MNMOS). A fração de MNMOS pode ser separada do restante das células da
12 medula óssea por gradiente de densidade (sendo as MNMOS menos densas). Esta
13 fração é bastante heterogênea e numerosa, não sendo necessária a proliferação em
14 cultura para obtenção de quantidade terapêuticamente suficiente (SAVITZ et al., 2011;
15 GIRALDI-GUIMARÃES et al., 2012). Ela é constituída por uma fração muito pequena
16 de células tronco mesenquimais, por uma pequena quantidade de células-tronco
17 hematopoiéticas (que representam apenas 0,0001% do total de células da medula
18 óssea), além de células progenitoras hematopoiéticas e células hematopoiéticas
19 diferenciadas (ORKIN, 2000; KRAUSE et al., 2001; GIRALDI-GUIMARÃES et al.,
20 2012).

21 Esta constituição heterogênea de células pode favorecer a quimioatração para
22 os tecidos lesados e a produção de várias citocinas e fatores tróficos que promovem
23 no tecido isquêmico, a angiogênese, neurogênese e neuroproteção (KRAUSE et al.,
24 2001; CHOPP; LI, 2002; CRAIN et al., 2005). As MNMOS não exigem manipulações
25 prolongadas, o que as torna mais seguras, principalmente em estudos clínicos com
26 um grande número de pacientes. Elas podem ser obtidas sem cultivo, sendo colhidas
27 entre 1,5 e 6 h para administração autóloga (IIHOSHI et al., 2004; BRENNEMAN et
28 al., 2010; WAGNER et al., 2012; SAMPAIO et al., 2013).

29 Foi demonstrado também que as MNMOS transplantadas, podem cruzar a
30 barreira hematoencefálica (BHE) e promover a recuperação funcional diminuindo a
31 neurodegeneração, promovendo a angiogênese e arteriogênese, a redução do nível

1 de citocinas pró-inflamatória e liberando numerosos fatores tróficos (BRENNEMAN et
2 al., 2010; SAMPAIO et al., 2013; WANG et al., 2013; HAO et al., 2014).

3 Apesar de alguns estudos demonstrarem que as MNMOs podem se diferenciar
4 em células gliais, neurônios, células do músculo liso e células endoteliais promovendo
5 assim efeitos benéficos (ZHANG et al., 2013; WANG et al., 2013), evidências recentes
6 sugerem que estas células promovem essas melhorias principalmente devido a
7 produção e secreção de citocinas e fatores tróficos, tais como, o fator de crescimento
8 de fibroblastos básico, fator neurotrófico derivado do cérebro, fator de crescimento
9 endotelial vascular e Fator neurotrófico derivado das células gliais (BRENNEMAN et
10 al., 2010; SHARMA et al., 2010; BANERJEE et al., 2012). Estes, por sua vez,
11 promovem uma resposta neuroprotetora, modulando a resposta inflamatória pós-
12 isquêmica e atenuando a morte das células neuronais e gliais (BAKER et al., 2007;
13 BRENNEMAN et al., 2010; HAO et al., 2011; SAVITZ et al., 2011; WAGNER et al.,
14 2012).

15 Avanços significativos têm sido feitos no campo da pesquisa com células-tronco
16 para o acidente vascular encefálico e os benefícios potenciais de tais tratamentos são
17 amplos, contribuindo favoravelmente para a neuroproteção e neurorestauração
18 (CEULEMANS et al., 2010). A tradução para a prática clínica, no entanto, tem um
19 longo caminho para ser percorrido. Uma série de ensaios clínicos está em andamento,
20 embora estudos pré-clínicos ainda precisam ser realizados para superar os desafios
21 ainda significativos, que impedem a utilização destas células como uma opção real de
22 tratamento (BANERJEE et al., 2012).

23

24

25

26

27

28

29

2.2.2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (CTM) representam uma rara subpopulação das células-tronco da medula óssea (< 0,01% das células mononucleares da medula óssea) que podem ser expandidas mitoticamente em meio de cultura. Em decorrência da facilidade em se dividir e proliferar, concluiu-se que as células-tronco mesenquimais seriam as células responsáveis pela manutenção e renovação dos tecidos mesenquimais adultos. Além disso, possuem a plasticidade de células multipotentes, com a capacidade de se diferenciarem em tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo, muscular, epitélio e, mais recentemente, neural (CAPLAN, 2005).

De 1968 a 1972 o laboratório do Doutor Arnold Caplan em Cleveland, desenvolveu e refinou métodos para o isolamento e cultura de células mesenquimais indiferenciadas, originadas das células germinativas dos membros de embriões de frango de quatro a cinco dias de idade. Essas células se multiplicavam em cultura e, dependendo das condições do cultivo e da densidade inicial no plaqueamento, elas se diferenciavam em músculo, cartilagem, ossos e vários outros tecidos conectivos. Quando havia uma densidade média nas placas de cultivo, havia o desenvolvimento de osteoblastos. Em uma densidade 2,5 vezes maior nas placas de cultivos dessas mesmas células, havia a formação de cartilagem com pouca ou nenhuma evidência de diferenciação em osteoblastos (CAPLAN, 2006).

Após essas descobertas no final do século passado, alguns trabalhos já demonstraram a habilidade das células tronco mesenquimais em se diferenciar em osso, cartilagem, músculo, ligamentos, tendões e estroma (KWAN et al., 2007).

A natureza estromal das células tronco mesenquimais pode ser caracterizada pela rápida aderência dessas células após o plaqueamento do aspirado de medula óssea em baixa densidade celular. Essas células aderentes, chamadas de CFU-F (*colony forming unit– fibroblasts*) proliferam e estabelecem colônias. Após a expansão *ex vivo*, elas têm a capacidade de gerar osso e compartimento medular estromal quando transplantadas para um sistema *in vivo* (KREBSBACH et al., 1997) e cartilagem, osso, tecido fibroso e gordura quando transplantadas para um sistema *in vivo* fechado sendo os primeiros trabalhos com resultados concretos e aplicabilidade

1 clínica foram os realizados com osteogênese e tecidos relacionados (ASHTON et al.,
2 1980; FRIEDESTEIN et al., 1970).

3 Uma característica importante desse tipo celular é que está presente em
4 diversos tecidos do organismo. A MO é um dos tecidos orgânicos mais ricos em
5 células mesenquimais indiferenciadas, mas também já foram encontradas e isoladas
6 de outros órgãos e tecidos, tais como sangue periférico, sangue de cordão umbilical
7 e placentário, tecido muscular e esquelético, derme e tecido adiposo (VERFAILLIE,
8 2002). Esse tipo de comportamento sugere que, apesar originarem da MO, as CTM
9 são circulantes, passando por órgãos e tecidos quando estes necessitam de reparos.
10 Isso ocorre por meio de um processo fisiológico estreitamente regulado por uma
11 complexa interação de citocinas, particularmente após a mobilização das células da
12 MO (CAPLAN, 2006).

13 As CTM podem ser transplantadas por duas vias: a) infusão ou implante
14 local no órgão lesado; b) infusão sistêmica. No primeiro caso, espera-se que as CTM
15 aumentem o reparo local e no segundo, que migrem para os tecidos lesados e tenham
16 papel ativo no reparo tissular (MINGUELL et al., 2000).

17 Ainda não podemos afirmar com certeza qual a ação das CTM no organismo.
18 Há estudos que alegam que esse tipo celular não possa regenerar diretamente as
19 células de um órgão lesado (assumindo que estas CT não sejam retiradas do próprio
20 órgão, caso em que esta capacidade seria preservada), mas de fato elas recuperam
21 parcialmente a função dos órgãos lesados por mecanismos ainda não totalmente
22 compreendidos, provavelmente estejam envolvidos mecanismos de secreção de
23 vários componentes pelas células injetadas, como: citocinas, fatores de crescimento,
24 fatores anti-apoptóticos, etc (CAPLAN, 2006).

25 Outro ponto importante das CTM é sua habilidade de aderência em substratos
26 plásticos, como por exemplo, as garrafas de cultivo. Essa propriedade pode ser usada
27 como um método de identificação e isolamento desse tipo celular. A principal
28 desvantagem para o uso das CTM é o fato de não serem capazes de permanecer em
29 um estado indiferenciado por longos períodos de tempo quando cultivadas *in vitro*, o
30 que dificulta sua utilização (CAPLAN, 2006).

31

2.2.3 CÉLULAS TRONCO DE TECIDOS DIVERSOS

Os tecidos de animais adultos têm uma reserva de CT chamadas de “células-tronco de tecido”. Durante o desenvolvimento dos vertebrados, as camadas germinativas embrionárias do ectoderma, mesoderma e endoderma se desenvolvem e começam o processo de diferenciação de suas células, participando assim, da formação dos tecidos e da organogênese. Dentro do tecido, elas estão localizadas em sítios específicos chamados “nichos”, que são diferentes para cada tipo de tecido, porém geralmente se encontram aderidos à membrana basal em áreas protegidas (CHA; FALANGA, 2007). Órgãos e tecidos maduros são auto suficiente, ou seja, eles podem compensar as células perdidas sem que haja um suplemento externo. As CT que neles residem, são suficientes para que haja a regeneração do tecido em casos de lesões e danos teciduais (LI et al., 2006).

Seu potencial de diferenciação é restrito, seguindo uma linhagem específica. Ou seja, elas têm a capacidade de gerar células especializadas apenas do próprio tecido em que residem (CHA; FALANGA, 2007). Porém, acredita-se que, quando transplantadas para outro tipo de tecido, essa diferenciação pode ser alterada. A esse evento dá-se o nome de “**transdiferenciação**” – capacidade pertencente a uma CT de um tipo específico de tecido em se diferenciar em outro (KORBLING; ESTROV, 2003; ROSENTHAL, 2003). Portanto o desenvolvimento tecido-específico das CT é limitado e ditado pelo ambiente original em que elas se encontram e, a partir de um novo estímulo, essa restrição é removida e dá às células o poder de mudar seu fenótipo de acordo com tipo de tecido de contato (YING et al., 2002).

A seguir alguns exemplos mais explorados de CT de tecidos:

- **Tecido Adiposo:** CTM, assim como as encontradas na MO, são observadas nesse tecido, sendo considerada uma fonte de CT com potencial para o tratamento de diversas afecções, entre as quais fraturas causadas em consequência de osteoporose, úlceras provocadas pelo diabetes, lesões no músculo cardíaco, etc.
- **Tecido Muscular:** chamadas também células satélites. São CT músculo-específicas encarregadas de regenerar o músculo lesado. Estão localizadas

1 entre os miócitos (células contráteis do tecido muscular) e a lamina basal das
2 fibras musculares esqueléticas (REHEN; PAULSEN, 2007).

- 3 • **Tecido Neural:** no sistema nervoso central existem duas classes de células:
4 células nervosas (neurônios) e as células da glia. As células da glia, por sua
5 vez, podem ser subdivididas em duas classes de acordo com o tamanho e
6 origem das células: a macroglia, composta por astrócitos e oligodendrócitos, e
7 a microglia (pequenas células nervosas muito ramificadas com potencial
8 fagocitário - macrófagos do sistema nervoso). As células nervosas e as da
9 macroglia são derivadas da linhagem ectodermal podendo ser isoladas a partir
10 de células tronco embrionárias. Já as da microglia, que representam
11 aproximadamente 5 a 20% das células da glia, têm como progenitoras células
12 de origem mesenquimatosa. Historicamente as células do sistema nervoso
13 central dos mamíferos eram consideradas como uma classe não renovável,
14 mas esse princípio da neurociência mudou a partir de pesquisas realizadas nas
15 últimas décadas, que demonstraram que existem células nervosas
16 progenitoras capazes de promover a divisão celular. Foi descoberta a
17 existência de duas regiões do cérebro humano onde é possível observar a
18 produção de novos neurônios (neurogênese): a zona subventricular (estrutura
19 cerebral situada na parede dos ventrículos laterais) e o giro denteado do
20 hipocampo (região considerada a principal sede de formação da memória).
21 Ambas as regiões são vistas como reservatórios de CT neurais. (REHEN;
22 PAULSEN, 2007). No entanto, no indivíduo adulto, estas células são incapazes
23 de regenerar porções lesadas do sistema nervoso, pois não tem a capacidade
24 de migrar para tais regiões, não refazendo, portanto, as conexões nervosas
25 espontaneamente.

- 26 • **Tecido Hepático:** para reparo e manutenção tecidual, o fígado possui dois
27 mecanismos internos. O primeiro é pela proliferação e hipertrofia dos
28 hepatócitos já existentes. O segundo mecanismo surge quando o fígado
29 precisa de uma severa demanda e os hepatócitos já não conseguem mais se
30 dividir; o reparo é então facilitado por células ovais que agem como CT tecido-
31 específicas. Geralmente estas células são constituídas por núcleos de formato
32 oval e estão localizadas ao redor dos ductos biliares, compreendendo uma
33 potente população de CT hepáticas. Seu poder de renovação é alto, podendo

1 se recompor inteiramente em duas ou três semanas. No fígado, podemos
2 encontrar cerca de sete tipos diferentes de células, e as CT hepáticas são
3 capazes de se transformarem em qualquer um desses tipos, dependendo do
4 estímulo recebido (REHEN; PAULSEN, 2007).

5 • **Tecido Gastrintestinal:** o epitélio gastrointestinal sofre constantes danos
6 físicos e químicos resultantes do processo de digestão. Porém as células
7 perdidas são repostas por CT presentes em nichos específicos situados na
8 parede do intestino (REHEN; PAULSEN, 2007).

9 • **Tecido Pancreático:** a presença de CT no pâncreas ainda não foi
10 completamente comprovada. Estudos recentes mostram que, em ratos, as
11 células pancreáticas secretoras de hormônios, incluindo as betas (produtoras
12 de insulina), são constantemente substituídas por progenitores epiteliais
13 localizados nos canais do pâncreas exócrino, sugerindo que possa existir uma
14 fonte de CT. Há uma grande expectativa depositada nessas células para a cura
15 do diabetes tipo I, com o intuito de conseguir a produção *in vitro* de células beta
16 produtoras de insulina (REHEN; PAULSEN, 2007).

17 • **Células-tronco Fetais:** no tecido fetal em formação são encontradas em
18 grande quantidade células primitivas multipotentes com características das
19 adultas. Em países em que a prática do aborto é permitida, estudos com células
20 fetais vêm sendo desenvolvidos (REHEN; PAULSEN, 2007).

21 • **Células-tronco da Polpa Dentária:** é possível observar a presença de CTM,
22 ou seja, com potencial multipotente, na polpa dos dentes de leite dos seres
23 humanos. Essa descoberta traz uma nova fonte de CT com fins terapêuticos
24 com a vantagem de ser um processo de fácil obtenção e não invasivo, já que é
25 considerado um material de descarte. Bancos de armazenamento de CT
26 dentárias já estão sendo criados, possibilitando sua utilização futura (REHEN;
27 PAULSEN, 2007).

28

29

30

1 2.3 MEDULA ESPINHAL

2

3 As lesões da medula espinhal em medicina veterinária ocorrem principalmente
4 nas espécies canina e felina, devido a causas endógenas ou exógenas. As causas
5 exógenas geralmente estão relacionadas a traumas (quedas, atropelamentos, maus
6 tratos). As lesões endógenas geralmente decorrem da extrusão ou protrusão do disco
7 intervertebral com conseqüente compressão do cordão medular espinhal, tumores,
8 anormalidades congênitas, genéticas, vasculares, entre outras (SHORES; BRAUND;
9 BRAWNER, 1990).

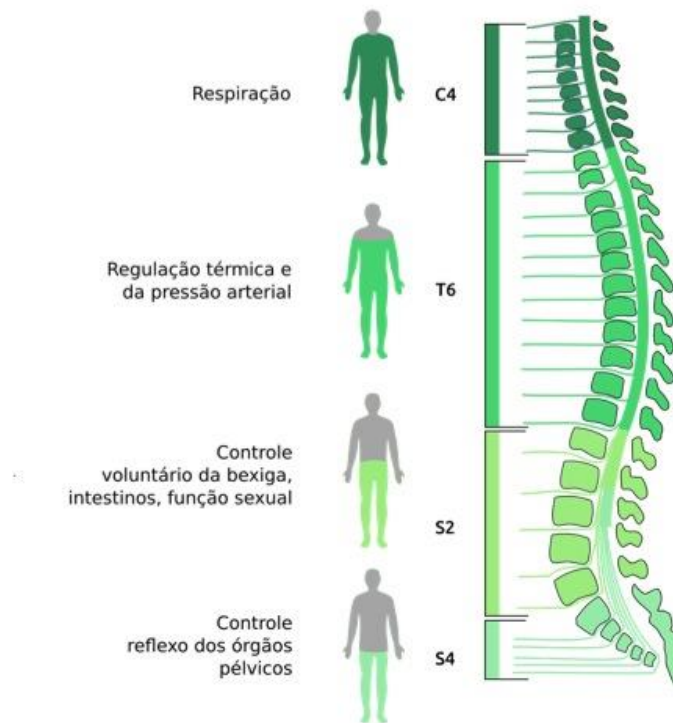
10 Na maior parte das doenças da medula espinhal nota-se déficit bilateral, mas
11 geralmente esse déficit é mais evidente no lado da lesão. Quando há lesão de medula
12 espinhal as informações proprioceptivas e nociceptivas e os impulsos motores
13 voluntários que se deslocam para o cérebro podem ser afetados. Em geral, na doença
14 progressiva da medula espinhal, nota-se inicialmente, déficit proprioceptivo, seguido
15 de déficit na capacidade motora voluntária e finalmente, déficit na percepção de
16 estímulos dolorosos (nocicepção), (SHORES; BRAUND; BRAWNER, 1990).

17 A medula espinhal está localizada dentro do canal vertebral e contém raízes
18 dorsais (sensitivas) e ventrais (motoras) que irão unir-se à saída de cada forame
19 intervertebral para formar os nervos espinhais do Sistema Nervoso Periférico
20 (LECOUTEUR; CHILD, 1992).

21 Em comparação com as outras regiões da coluna vertebral, a região cervical
22 apresenta um espaço maior dado ao maior diâmetro do canal medular, sendo que
23 esse espaço residual se encontra preenchido pela gordura epidural (Figura 2)
24 (WHEELER; SHARP, 2005). A medula espinhal afunila-se formando o cone medular
25 e termina próximo ao segmento vertebral L6 na maioria dos cães e L7 em gatos
26 formando, a partir desse ponto, a cauda eqüina. A medula espinhal pode ser dividida
27 de acordo com os segmentos medulares da seguinte forma:

- 28 • Cervical (C1-C8); Torácica (T1-T13); Lombar (L1-L7); Sacral (S1-S3) e caudal
29 ou coccígea, em número variável (LECOUTEUR; CHILD, 1992).

30



1

2 **Figura 2.** Níveis da lesão medular e sistemas afetados. Fonte:
 3 <http://cienciasecognicao.org/neuroemdebate/?p=1983>.

4

5 Nos segmentos correspondentes ao plexo braquial (C6-T2) e lombossacral
 6 (L4–S2) encontram-se as intumescências cervical e lombar, que apresentam o
 7 diâmetro aumentado pelo fato de se localizarem nessas regiões os corpos dos
 8 neurônios motores inferiores para os membros pélvicos e torácicos (GHOSHAL, 1986;
 9 PRATA, 1993).

10

11

12

1 **2.3.1 TRATOS MEDULARES**

2

3 Os tratos medulares podem ser resumidamente divididos em Trato Sensorial
4 Ascendente e Tratos Motores Descendentes. O conhecimento do trajeto dos tratos e
5 sua localização, na periferia ou interior da medula espinhal, refletem-se diretamente
6 nos sinais clínicos e na gravidade das lesões medulares, contribuindo ainda para o
7 prognóstico dos animais principalmente no que concerne à via da dor (PELLEGRINO,
8 2003).

9 A substância branca ocupa a área periférica da medula espinhal e é a primeira
10 afetada em casos de lesão medular. Nessa região encontra-se o trato ascendente ou
11 sensorial, que carrega as informações sensitivas do Sistema Nervoso Periférico (SNP)
12 e conduz ao Sistema Nervoso Central (SNC), (WOLF, 1993).

13 Trato sensorial ascendente é a região cuja função compreende a transmissão
14 da sensibilidade exteroceptiva da superfície corporal e a propriocepção desde a parte
15 mais profunda do aparato locomotor, ou seja, tendões, articulações e músculos. Esta
16 última é transmitida pelos tratos do funículo dorsal e lateral. A partir daí os axônios
17 são projetados tanto para a área somestésica do córtex quanto para o cerebelo. A
18 temperatura e a dor superficial são transmitidas pelas fibras mielínicas de vários tratos,
19 incluindo o espinotalâmico lateral, no funículo lateral. A dor nociceptiva é carregada por
20 fibras não mielinizadas, particularmente do trato espinoreticular e proprioespinhal. As
21 informações sobre a repleção da bexiga também são conduzidas via trato
22 espinotalâmico até o cérebro (PELLEGRINO, 2003).

23 Já com relação aos tratos descendentes dois sistemas são responsáveis pela
24 transmissão da função motora, o sistema de Neurônio Motor Superior (NMS) e o
25 Inferior (NMI). O NMS compreende a idéia de projeção dos neurônios de comando
26 situados no córtex motor primário e núcleos do tronco encefálico, que ativam ou inibem
27 os motoneurônios do corno ventral da substância cinzenta medular. Eles exercem
28 normalmente uma ação inibitória sobre a atividade motora intrínseca de cada
29 segmento medular. Quando ocorre uma lesão em NMS ocorre uma liberação dessa
30 atividade, desencadeando-se um conjunto de sinais e sinais clínicos conhecidos como

1 “Síndrome do NMS”, caracterizada entre outros por hiperreflexia (PELLEGRINO,
2 2003).

3 O NMI compõe o neurônio efector do arco reflexo. Seus corpos celulares se
4 encontram na região ventral da substância cinzenta. Os axônios emergem da medula
5 espinhal nas raízes ventrais e passam através dos plexos lombossacrais e braquiais
6 para formarem os troncos nervosos periféricos para os membros. No cão ainda se
7 identifica um trato motor ascendente, originário das células marginais da substância
8 cinzenta do segmento medular lombar L1-L7. Seus axônios inibem os neurônios
9 motores extensores dos membros torácicos e lesões que interfiram nesse trato
10 manifestam-se com o sinal de Schiff-Sherrington, isto é, hiperextensão de membros
11 torácicos e flacidez de membros pélvicos (PELLEGRINO, 2003).

12

13 **2.3.2 DISCOS INTERVERTEBRAIS**

14

15 Os discos intervertebrais são ricos em água e são compostos pelo anel fibroso,
16 constituído de material fibrocartilagenoso e pelo núcleo pulposo, constituído de
17 material gelatinoso. A capacidade de absorver impacto diminui com a idade e os
18 processos degenerativo. O disco é aparentemente nutrido por difusão das placas
19 terminais das vértebras ou tecidos adjacentes, uma vez que é controversa a existência
20 de um sistema vascular para sua manutenção (JEAN, 2010).

21 O ligamento longitudinal dorsal e o anel fibroso, especialmente na sua lâmina
22 mais externa, são estruturas inervadas e capazes de causarem a percepção da dor
23 (SIMPSON, 1992).

24 Os ligamentos do canal vertebral têm um significado importante na estabilidade
25 e mobilidade da coluna. A sustentação que proporcionam varia nas diferentes regiões
26 da coluna vertebral. O ligamento longitudinal dorsal possui uma estrutura larga e
27 espessa na região cervical, oferecendo maior resistência a herniação dorsal do disco;
28 entretanto, torna-se mais delgado nas regiões torácica caudal e lombar, o que permite
29 a herniação e conseqüente compressão da medula . Na coluna torácica, isto é, entre
30 T1 e T11, a protrusão ou extrusão é menos comum, devido aos ligamentos

1 intercapitais (conjugal) que unem as cabeças das costelas opostas, cruzando o
2 assoalho do canal espinhal, por sobre o anel fibroso dorsal (LECOUTEUR; CHILD,
3 1998).

4

5 **2.4 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO MEDULAR AGUDA**

6

7 O trauma medular agudo resulta em lesões por meio de dois mecanismos. A
8 lesão **primária** é decorrente das forças que causam dano mecânico instantaneamente
9 após o evento traumático, tais como compressão, transecção, laceração, flexão e
10 tração (BERGMAN et al., 2000). O que ocorre no momento do trauma, envolve a
11 ruptura e o esmagamento de elementos neurais e vasculares incluindo a ruptura de
12 axônios, corpos celulares nervosos e estruturas de suporte (células da glia) resultando
13 em interrupções fisiológicas e ou morfológicas dos impulsos nervoso (WALMSLEY,
14 2006).

15 A lesão **secundária** desenvolve-se minutos ou dias após o trauma, devido a
16 alterações locais intracelulares e extracelulares, associada a lesões sistêmicas como
17 hemorragia, hipóxia e outras decorrentes do trauma. (LECOUTER, 1998). O
18 traumatismo inicial pode deflagrar uma cascata de eventos destrutivos que causam a
19 perda do tecido neural inicialmente não comprometido (COUGHLAN, 1993;
20 BERGMAN et al., 2000).

21 Várias alterações sistêmicas, focais e celulares caracterizam as lesões
22 secundárias, resultando em mudanças biomecânicas e patológicas que podem causar
23 deterioração funcional e comprometer a integridade estrutural da medula espinhal
24 (MEINTJES; HOSGOOD; DANILOFF, 1996).

25 Os eventos envolvidos durante essa fase fazem com que a sobrevivência
26 neuronal seja escassa e a recuperação funcional prejudicada. Ademais, é durante
27 esse momento da (MCDONALD; SADOWSKY, 2002; VAWDA; FEHLINGS, 2013;
28 DASARI et al., 2014).

29 Nas primeiras duas horas após o trauma, ocorre a fase denominada de
30 imediata onde há morte neuronal e glial acompanhada de choque medular e

1 consequente perda funcional motora no nível da lesão e abaixo (DITUNNO et al.,
2 2004; NORENBORG et al., 2004; BOLAND et al., 2011). O trauma medular está
3 associado ainda à liberação excessiva de glutamato, o principal neurotransmissor
4 excitatório do SNC, que, especialmente no ambiente hipóxico da medula lesionada,
5 leva ao estímulo exagerado dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, resultando
6 na morte celular por excitotoxicidade. As células da glia também são atingidas, sendo
7 os oligodendrócitos os mais prejudicados, uma vez que apresentam maior
8 permeabilidade ao cálcio e sofrem sensibilização por ciclooxygenase-2, resultando em
9 morte excitotóxica (PROFYRIS et al., 2004; CARLSON et al., 2010; GERARDO-
10 NAVA et al., 2013; WANG et al., 2013). Ocorre, ainda, o aparecimento de pontos
11 hemorrágicos distantes do sítio da lesão original como resultado da perda de
12 integridade estrutural dos capilares sanguíneos e há o aumento da expressão do fator
13 de necrose tumoral- alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) (DONNELLY; POPOVICH,
14 2008; DAVID; KRONER, 2011).

15 Entre 2 e 48 horas após o trauma medular inicial temos a fase aguda. Nesse
16 momento, forma-se uma volumosa área hemorrágica, resultando em uma isquemia
17 (TATOR; FEHLINGS, 1991). Este fenômeno é particularmente importante uma vez
18 que a hemoglobina liberada é tóxica às células do SNC, expandindo o volume de
19 tecido neural destruído. Relacionado a estes eventos, ocorre o infarto tecidual que
20 propaga a necrose do tecido nervoso e é intensificado por mecanismos como a
21 trombose e o choque neurogênico (REGAN; GUO, 1998; GERZANICH et al., 2009).

22 A isquemia e o processo hemorrágico estão relacionados a permeabilidade da
23 barreira hematoencefálica/hematoespinal, uma vez que a lesão medular causa uma
24 interrupção nessas barreiras, atingindo uma interrupção máxima 2 horas após o
25 trauma e retornando a níveis fisiológicos 2 semanas depois do trauma inicial
26 (FIGLEY et al., 2014).

27 Dentre as primeiras 24 horas após o trauma inicial, ocorre um processo
28 chamado choque medular, ou seja, a ausência de reflexos espinhais caudais. O
29 choque medular é diferente do choque neurogênico, já que esse representa uma
30 condição em que o paciente apresenta hipotensão e bradicardia devido a perda da
31 resistência vascular periférica, enquanto aquele está relacionado a interrupção das

1 funções neurais distal à lesão, incluindo reflexo, sensibilidade e força motora
2 (DITUNNO et al., 2004).

3 Além disso, a interrupção das barreiras hematoencefálicas e hematoespinal
4 permite a infiltração de células do sistema imune para o SNC, tais como células T,
5 neutrófilos e monócitos. As micróglia residentes continuam a proliferar e se ativam
6 durante a fase aguda, resultando na liberação acentuada de quimiocinas e citocinas
7 (DONNELLY; POPOVICH, 2008; TZEKOU; FEHLINGS, 2014). Dessa forma, durante
8 as primeiras 24 horas após o trauma medular, os neutrófilos chegam ao sítio da lesão
9 e há liberação de citocinas, MMPs, mieloperoxidase e espécies reativas de oxigênio
10 (FLEMING et al., 2006; DONNELLY; POPOVICH, 2008). Assim, em 48 horas ocorre
11 uma migração de monócitos e os neutrófilos já não são mais recrutados. Já em 72
12 horas, ocorre uma expansão da lesão secundária, uma vez que os monócitos iniciam
13 sua diferenciação para macrófagos e há liberação de glutamato, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e
14 prostanoídes (LESKOVAR et al., 2000; SCHWAB et al., 2000).

15 Depois da primeira semana após a lesão medular inicial, ocorre uma redução
16 de macrófagos, porém a ativação de microglia persiste por semanas (DONNELLY;
17 POPOVICH, 2008). O resultado final dos eventos da fase aguda é a morte celular por
18 apoptose e a desmielinização (YU et al., 2009).

19 Entre os primeiros dois dias e duas semanas da lesão medular traumática os
20 astrócitos tornam-se hipertróficos e proliferativos e inicia-se a formação da “cicatriz
21 glial”, a qual é responsável por uma barreira física e química para a regeneração da
22 medula espinhal (KARIMI-ABDOLREZAEI et al., 2010; KARIMI-ABDOLREZAEI et
23 al., 2012; YOUNG, 2014).

24 Uma fase intermediária se inicia entre a segunda e terceira semana após o
25 trauma e tem duração aproximada de 6 meses. Durante esse momento a reação de
26 gliose continua até a cicatriz glial se formar por completo. A cicatrização glial é um
27 fator crucial na recuperação de lesões no SNC, pois a eliminação do contingente de
28 astrócitos reativos leva ao aumento do tamanho da lesão e a uma perda exagerada
29 de macromoléculas através da barreira hematoencefálica que se encontra
30 comprometida (FAULKNER et al., 2004; MYER et al., 2006). Por conta disso, as falhas
31 na regeneração axonal devem-se a produção de moléculas inibitórias pelos astrócitos
32 a partir da cicatriz glial (FITCH; SILVER, 2008). A contribuição dos astrócitos na

1 ausência de regeneração no SNC deve-se a: (1) falha em proporcionar um substrato
2 celular apropriado para o crescimento axonal; (2) ausência de fatores apropriados que
3 suportem o crescimento axonal; (3) produção de moléculas que inibem o alongamento
4 axonal, como os proteoglicanos (JONES et al., 2003). Além dos astrócitos, a mielina
5 do SNC também produz a glicoproteína associada à mielina (MAG), a Nogo-A e a
6 glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (Omgp), substâncias capazes de inibir o
7 crescimento de axônios, pois estão localizadas na porção interna da bainha de
8 mielina, fazendo contato direto com os axônios (WANG et al., 2002;
9 SCHWEIGREITER; BANDTLOW, 2006; FITCH; SILVER, 2008).

10 Uma lesão medular é considerada crônica a partir do sexto mês do trauma
11 inicial. Durante esse momento a cicatriz glial e os cistos/cavidades na medula espinhal
12 já estão desenvolvidos e estabelecidos. Os cistos são resultados dos restos de tecido
13 neural e representam uma barreira física que impede a regeneração axonal. Nesse
14 momento a degeneração walleriana (retração axonal) continua e pode durar anos até
15 que os corpos celulares e os restos de axônios sejam totalmente removidos do sítio
16 da lesão (FLEMING et al., 2006; KRAMER et al., 2013). Tendo em vista o
17 conhecimento sobre a fisiopatologia de processo, as pesquisas dedicadas à lesão
18 medular têm se voltado a estratégias que visam o controle da excitotoxicidade e da
19 inflamação, a inibição de apoptose celular, o reparo da desmielinização, a
20 regeneração axonal e restauração da sua condutibilidade e conectividade, a
21 minimização das disfunções autonômicas, além da restauração de coordenação
22 motora ou o alívio de comorbidades que afetam os lesados medulares (THURET et
23 al., 2006; SAMADIKUCHAKSARAEI, 2007).

24 A medula espinhal pode ser lesionada de forma aguda por meio de quatro
25 mecanismos básicos, que incluem: a interrupção anatômica, a concussão, a
26 compressão e a isquemia. A interrupção anatômica é a destruição física (total ou
27 parcial) do tecido nervoso, ocorrendo mais freqüentemente nos casos de fratura,
28 luxações e subluxações vertebrais. (CROWE, NETO, RABELO, 2005).

29 A compressão é um efeito em massa, freqüentemente causado por extrusão
30 de disco intervertebral, causando aumento da pressão no interior do canal vertebral
31 (CROWE, NETO, RABELO, 2005). Os graus de compressão na doença do disco
32 intervertebral (DDIV) dependem do volume da massa, do diâmetro do canal (sendo

1 mais grave na região torácica) e do grau de desidratação da massa do núcleo pulposos,
2 no qual o material do disco voltara a se hidratar dentro do canal vertebral, devido ao
3 componente hídrico da gordura epidural (VAN DUIJNHOVEN, 2009). Nos casos de
4 fraturas/luxações vertebrais, a compressão é na maioria das vezes causada por
5 fragmentos ósseos e coágulos (CAMBRIDGE et al., 1997). Na extrusão de disco
6 intervertebral, a concussão e a compressão costumam ocorrer em conjunto (Figura
7 3).

8 Ao contrário do que ocorre nas lesões concussivas, a substância branca é mais
9 susceptível que a cinzenta nos eventos compressivos, uma vez que, ao tentar
10 preservar os corpos neurais, ocorre depleção da mielina e dos axônios para acomodar
11 a massa compressiva. (CROWE, NETO, RABELO, 2005).

12 A isquemia compreende a interrupção do suprimento sanguíneo arterial para a
13 medula espinhal. É geralmente causado por embolismo (na maioria das vezes por
14 embolo fibrocartilaginoso), no qual a interrupção sanguínea pode ser transitória ou
15 permanente. Quando ocorre a reperfusão tecidual, a reintrodução do oxigênio resulta
16 em formação de radicais livres, que iniciam o processo de peroxidação lipídica. A
17 substância cinzenta é mais sensível a essa lesão que a substância branca, uma vez
18 que em condições normais a proporção da circulação em relação às substâncias
19 cinzenta e branca é de 5:1. As lesões celulares se iniciam na substância cinzenta e
20 se estendem circunferencialmente por todo um segmento espinhal (KRAUS; KIRKER-
21 HEAD, 2006).

22



1

2 **Figura 3.** Eventos fisiopatológicos após a lesão medular traumática. Os eventos estão
 3 divididos em fase imediata (2 horas), aguda (2 a 48 horas), subaguda (48 horas a 14
 4 dias), intermediária (14 dias a 6 meses) e crônica (a partir de 6 meses). Adaptado de
 5 Siddiqui et al, 2014.

6

7 **2.4.1 EFEITO IMEDIATO DO TRAUMA A NÍVEL CELULAR**

8

9 Após o impacto na medula espinhal, existe um bloqueio total da condução
 10 nervosa devido ao influxo de potássio advindo das células lesadas mecanicamente. A
 11 mudança da quantidade de potássio extracelular e intracelular promove a
 12 despolarização e consequente bloqueio de condução (OLBY; JEFFERY, 2003).

13

14

15

2.4.2 ALTERAÇÕES VASCULARES

Após o trauma ocorre à perda da autorregulação do fluxo sanguíneo no segmento medular afetado e a pressão de perfusão torna-se diretamente relacionada à pressão arterial sistêmica, que na maioria das vezes esta baixa devido às lesões sistêmicas concomitantes. O fluxo sanguíneo na substância cinzenta reduz drasticamente durante as primeiras duas horas e permanece baixo nas primeiras 24hs. Na substância branca o fluxo sanguíneo também é comprometido dentro das primeiras 6 horas após a lesão, mas retorna ao normal (CAMBRIDGE, 1997).

O aumento da concentração de substâncias vasoconstritora (como por exemplo, a prostaglandina $PGF2\alpha$ e o tromboxano $A2$) no segmento lesado, somado a hipotensão do sistema que ocorre após o trauma, pode causar o declínio do fluxo sanguíneo medular, levando a isquemia neural (KAZAKOS et al., 2005).

O decréscimo de perfusão na área lesada reduz o suprimento de oxigênio e energia para os neurônios e células da glia, causando dano a membrana celular, levando ao aumento da sua permeabilidade e conseqüente penetração de fluidos, componentes sanguíneos e substância lesivas aos neurônios (OLBY, JEFERRY, 2003).

Logo após a lesão concussiva severa, a hemorragia que ocorre na substância cinzenta também causa decréscimo generalizado no fluxo sanguíneo medular. A isquemia causada pela lesão afeta principalmente a substância cinzenta da medula espinhal, pois comparada a substância branca essa região da medula é mais vascularizada e possui uma maior necessidade de oxigênio e glicose.

A compressão da medula espinhal decorrente de eventos primários é tipicamente associado ao desenvolvimento de edema vasogênico, que ocorre devido a obstrução da drenagem venosa. O edema vasogênico associado a compressão aumenta a pressão intraparenquimatosa, exacerbando os eventos isquêmicos (CROWE; RABELO, 2005).

2.4.3 PRINCIPAIS EVENTOS BIOQUÍMICOS

Momentos após a ocorrência da lesão ocorrem mudanças metabólicas severas, associadas a redução do fluxo sanguíneo na medula espinhal. Normalmente a concentração de L-Glutamato, que é um neurotransmissor excitatório, é regulada por um mecanismo ativo e eficiente efetuado por astrócitos. O dano mecânico aos neurônios associado a falta de energia local, leva ao aumento da liberação neural de glutamato e decrescimento da ação do mecanismo dos astrócitos sobre o mesmo, elevando a concentração deste neurotransmissor a níveis tóxicos. A interação do L-glutamato com o receptor N-metil-D-asparato (NMDA), um receptor para L-glutamato nas membranas pós-sinápticas, abrem os canais de sódio, cloreto e principalmente cálcio. (SEILER et al., 2012).

O aumento da concentração do cálcio intracelular ativa proteases como a calpaína e a capase, que destroem o citoesqueleto e o DNA cromossomal iniciando a necrose e a apoptose. Isso ativa também a fosfolipase A2 que inicia a resposta inflamatória. A ativação da fosfolipase A2 desencadeia a produção de leucotrienos, tromboxanos, histamina, prostaglandinas. O aumento nos níveis de prostaglandinas causa o aumento da permeabilidade vascular e vasoconstrição ou vasodilatação. Ocorre também alteração da função plaquetária, que pode causar obstrução de vasos sanguíneos e liberação de serotonina, a qual também ativa a permeabilidade vascular, favorecendo a formação de edema (SEILER et al., 2012).

Na lesão medular aguda, há acúmulo de metabólitos e enzimas que, ao entrarem em contato com o oxigênio, geralmente, após a reperfusão capilar, resultam em formação e acúmulo de radicais livres extremamente reativos, que, quando reagem com moléculas normais, levam a formação de outras espécies de radicais livres, criando assim uma reação em cadeia. Imediatamente após a lesão da medula espinhal, os níveis teciduais dos subprodutos dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular ficam aumentados, enquanto os níveis de antioxidantes endógenos como o alfatocoferol sofrem depleção (BRAUER; JAMBROSZYK; TIPOLD, 2011).

Após a hemorragia devida a uma lesão medular, ocorre extravasamento de componentes sanguíneos, como ferro e cobre, e produtos da degradação da

1 hemoglobina como a hematina, que catalisam o processo de peroxidação da
2 membrana (TIRALOCHE et al., 2005).

3

4 **2.4.4 REAÇÃO INFLAMATÓRIA**

5

6 A lesão traumática do sistema nervoso central desencadeia rapidamente uma
7 resposta inflamatória que se desenvolve após o impacto inicial. Tal resposta
8 inflamatória resulta na produção de uma variedade de citotoxinas e agentes
9 protetores. As células microgliais liberam citocinas, interleucina-1, fator alfa de
10 necrose tumoral e produtos tóxicos potentes como o peróxido de hidrogênio, óxido
11 nítrico e proteinases, minutos após a ocorrência da lesão (OLBY; JEFERY, 2003). Os
12 mediadores inflamatórios têm efeitos prejudiciais na condução iônica e transmissão
13 sináptica, alterando a função neural (MCDONALD et al., 1998).

14 Atualmente, tornou-se claro que a resposta neuroinflamatória também pode ser
15 prejudicial, uma vez que ataques severos de inflamação aguda ou prolongada podem
16 produzir danos secundários a lesão inicial, reduzir a viabilidade neuronal e interferir
17 nos processos de regeneração do cérebro (LUCAS et al., 2006; LELEKOV-
18 BOISSARD et al., 2009; CEULEMANS et al., 2010; BORLONGAN et al., 2012). Além
19 disso, a resposta inflamatória contribui para a formação de lesões teciduais após lesão
20 isquêmica (IADECOLA; ANRATHER, 2011; BORLONGAN et al., 2012; FORGHANI et
21 al., 2014).

22 Ocorrem duas fases de infiltração celular durante o desenvolvimento da
23 resposta inflamatória na lesão medular. Inicialmente há um influxo de neutrófilos que
24 atingem níveis máximos dentro de poucas horas, havendo então o posterior
25 recrutamento de macrófagos cujo o pico é estabelecido entre 5 a 7 dias (DUSART;
26 SCHWAB, 1994). Esta segunda fase de infiltração celular coincide com a
27 desmielização secundária e perda de axônios. Na medula espinhal lesada pode-se
28 constatar a presença de leucócitos polimorfonucleares fagocíticos no interior e
29 adjacentes as paredes vasculares e as áreas hemorrágicas, sugerindo a possibilidade
30 do trauma induzir a ativação das lipases das membranas hidrolizando os fosfolídeos

1 das mesma e liberando vários ácidos graxos, principalmente o ácido araquidônico.
2 (OLBY; JEFERY, 2003).

3

4 **2.5 TERAPIA CELULAR**

5

6 A terapia celular é um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas
7 fundamentadas no conhecimento de várias ciências, que visa a transferência de
8 células com fins terapêuticos de diversas doenças. É realizada através da inoculação
9 de células em determinado individuo, com a expectativa de que estas proliferem, se
10 diferenciem ou secretem fatores que promovam a regeneração dos tecidos lesionados
11 (TRINDADE et al., 2012).

12 Estima-se que o mercado para produtos e serviços que envolvam terapias
13 celulares seria de cerca de US\$ 24,6 bilhões em 2005 e que possa chegar a US\$ 68,9
14 bilhões em 2010. Nos EUA, onde a legislação permite patentear linhagens celulares
15 e tecnologias que envolvam o uso de células tronco, já foram concedidas mais de
16 2.000 patentes relevantes para uso em doenças e há mais de 100 companhias que
17 detem patentes relacionadas ao uso de células tronco em humanos. Se algumas
18 destas linhagens patenteadas se tornar uma terapia nos veremos na situação de ter
19 que pagar para utilizar estas células. Por outro lado, no Brasil a legislação não permite
20 patentear estas células o que significa que qualquer terapia aqui gerada seria gratuita
21 para os pacientes (MENDEZ-OTERO et al. 2007).

22 Atualmente, há estudos do emprego da terapia celular para casos de infarto do
23 miocárdio, diabetes tipo I, lesão da medula espinhal, enfermidades pulmonares,
24 tratamento de leucemias, doenças renais, reconstituição do tecido epitelial, fraturas
25 com grandes perdas ósseas, disfunção muscular, na recuperação da cartilagem,
26 tendinite, desmíte, lesões de córnea (SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007).

27 As abordagens utilizando células-tronco têm emergido como um tratamento
28 promissor, apresentando o potencial de agir sobre vários mecanismos de lesão,
29 promovendo a neuroproteção e neuroreparo, via secreção de vários fatores tróficos,
30 migração, diferenciação e regeneração dos neurônios e células gliais (BAO et al.,

1 2011; WAGNER et al., 2012; CHEN et al., 2013; ZHANG et al., 2013; CHEN et al.,
2 2014; HAO et al., 2014).

3 Neste sentido, as pesquisas dedicadas à lesão medular traumática têm se
4 voltado a estratégias que visam o controle da excitotoxicidade e da inflamação, a
5 inibição de apoptose celular, o reparo da desmielinização, a regeneração axonal e
6 restauração da sua condutibilidade e conectividade, a minimização das disfunções
7 autonômicas, além da restauração de coordenação motora ou o alívio de
8 comorbidades que afetam os lesados medulares (THURET et al., 2006;
9 SAMADIKUCHAKSARAEI, 2007).

10 A utilização desta terapia na medicina veterinária está em intensa expansão,
11 pois fornece aos veterinários uma opção para o tratamento de diversas condições
12 patológicas de difícil regeneração tecidual (CLEGG; PINCHBECK, 2011;
13 GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011; STEWART, 2011).

14 Em equinos a terapia celular tem como fontes de células mesenquimais a
15 medula óssea e o tecido adiposo para a regeneração musculoesquelética em cavalos
16 (GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011; BURK et al., 2013a), sendo os resultados bastante
17 satisfatório em diversas desordens neuromusculares e esqueléticas (RICHARDSON
18 et al., 2007; TAYLOR et al., 2007; BREMS; JEBE, 2008; BORJESSON; PERONI,
19 2011; CLEGG; PINCHBECK, 2011; STEWART, 2011; BURK et al., 2013b).

20 As células tronco são uma real e promissora opção para a medicina
21 regenerativa. Entretanto, devido a controvérsias políticas e éticas que cercam o uso
22 de células tronco embrionárias, os pesquisadores procuram focar suas atenções em
23 fontes de células tronco multipotentes pós-natais (KWAN et al., 2007).

24 A osteogênese *in vitro* das células tronco é a mais comprovada forma de terapia
25 celular já que células obtidas da medula óssea de frangos, camundongos, ratos,
26 coelhos, porcos (JAISWAL et al., 1997), seres humanos (MAJORS et al., 1997),
27 cavalos (ARNHOLD et al., 2007), cães (VOLK et al., 2005) e gatos (MARTIN et al.,
28 2002) em resposta a diversos fatores bioativos incluindo osteogenina, proteína
29 morfogenética óssea-2 (BMP-2), peptídeos de crescimento osteogênico,
30 glicocorticóide sintético dexametasona (JAISWAL et al., 1997) , ácido ascórbico, β

1 glicerolfosfato (KWAN et al., 2007) e o flavonóides da erva *Herba Epimedii* já foi
2 demonstrada (ZHANG et al., 2009).

3 As células-tronco derivadas de medula óssea, mais usadas nas terapias
4 celulares são as Células Mononucleares de Medula Óssea (MNMOS) e as células
5 tronco mesenquimais (CTMs) derivadas do cultivo das MNMOS. A fração de MNMOS
6 pode ser separada do restante das células da medula óssea por gradiente de
7 densidade (sendo as MNMOS menos densas). Esta fração é bastante heterogênea e
8 numerosa, sendo necessária a proliferação em cultura necessária apenas para
9 obtenção de quantidade suficiente de células mesenquimais (SAVITZ et al., 2011;
10 GIRALDI-GUIMARÃES et al., 2012)

11 A constituição heterogênea de todas essas células pode favorecer a
12 quimioatração para os tecidos lesados e a produção de várias citocinas e fatores
13 tróficos que promovem no tecido isquêmico, a angiogênese, neurogênese e
14 neuroproteção (KRAUSE et al., 2001; CHOPP; LI, 2002; CRAIN et al., 2005).

15 Com relação a utilização da terapia celular na neurologia, vários estudos tem
16 comprovado que este tipo de terapia é um procedimento que auxilia a regeneração
17 nervosa; porém, ainda restam dúvidas a respeito dos mecanismos através dos quais
18 as CT produzem subtipos específicos (NUNES; ZATZ, 2006).

19 O tratamento com MNMOS reduziu a infiltração de neutrófilos no parênquima
20 cerebral após a isquemia e os animais tratados com estas células apresentaram
21 menor atividade da enzima MPO, em comparação com os animais controles. Os
22 resultados sugerem que o tratamento do AVE com o MNMOS pode ser benéfico
23 (COELHO; GIRALDI-GUIMARÃES, 2014)

24 Podemos citar também os estudos realizados por Chen et al. (2007), os quais
25 avaliaram a regeneração do nervo ciático de 40 ratos, após remoção cirúrgica
26 experimental de 15 milímetros deste nervo com imediata reconstrução cirúrgica
27 através de uma câmara de silicone interposta entre os cotos nervosos. Neste estudo,
28 20 animais receberam tratamento adicional com CT mesenquimais e o mesmo
29 número de animais não as receberam. Os autores observaram que, a progressão do
30 processo regenerativo nos animais que receberam terapia celular, apresentavam alta

1 expressão de fatores neutrofílicos. Assim, a utilização de células tronco mesenquimais
2 evidenciou forte associação com estes fatores, favorecendo a regeneração neural.

3 Nesta linha de pesquisa, Shimitzu et al. (2007) compararam a utilização de
4 células tronco mesenquimais de ratos wistar, diferenciadas e não diferenciadas, *in*
5 *vitro*, em células de Schwann, como coadjuvante à regeneração do nervo ciático. As
6 células não diferenciadas, expressaram marcadores para células de Schwann *in vivo*
7 e apoiaram a regeneração axonal. Os autores concluíram que as células tronco
8 mesenquimais não diferenciadas podem ser um substituto das células de Schwann,
9 podendo ser aplicada para regeneração nervosa.

10 Já Braga-silva et al. (2006) compararam o efeito das células de medula óssea,
11 do plasma rico em plaquetas, e a combinação de ambos na regeneração de neurônios
12 associado a técnicas convencionais em comparação com técnicas cirúrgicas
13 convencionais utilizadas como único tratamento. Como resultados, estes autores
14 observaram melhor performance funcional, avaliada pelo teste de marcha nos ratos
15 tratados com CT de medula óssea quando comparados com os demais grupos.
16 Histologicamente, no grupo CT, verificaram axônios mielínicos e amielínicos em
17 quantidade adequada ao comparar com o grupo que só recebeu tratamento cirúrgico
18 e plasma rico em plaquetas.

19 Em contrapartida, estudo realizado em coelhos por Colomé et al. (2008), com
20 o intuito de verificar a eficácia da regeneração nervosa utilizando CT autólogas de
21 medula óssea como terapia adicional à tubulização do nervo tibial, demonstrou
22 apenas significância no que diz respeito a presença de degeneração Walleriana. Estes
23 autores concluíram que a terapia celular apresentou vantagens no processo de
24 regeneração do nervo periférico, aos 30 dias de pós-operatório.

25 Pesquisas adicionais ainda são necessárias para a compreensão dos
26 mecanismos de diferenciação celular e há a necessidade de buscar o conhecimento
27 a respeito do direcionamento das CT adultas (homing) para diferentes
28 microambientes. Isto se faz essencial para que possa ser detectado com clareza, se
29 estas células são capazes de originar diferentes linhagens neurais, quando injetadas
30 por via venosa ou localmente (NUNE; ZATZ, 2006).

1 Dentro da terapia celular do sistema nervoso central existem experimentos que
2 estudam as CT neurais. O conceito de que o sistema nervoso central de mamíferos
3 adultos, possuem CT neurais foi primeiramente evidenciado pela renovação neural
4 ocorrida no bulbo olfatório e hipocampo de animais adultos (ALTMAN; DAS, 1966). A
5 multipotencialidade das CT neurais foi demonstrada nos anos noventa pela sua
6 habilidade de se diferenciar em neurônios, astrócitos, e oligodendrócitos assim como
7 várias formas de precursores neurais (FLAX et al., 1998). Além disto em experimentos
8 “in vivo”, estas células em modelos animais de doenças neurodegenerativas foram
9 associadas a vários níveis de recuperação funcional (OURIDNIK et al., 2002).

10 Ainda não se determinou de forma precisa o perfil de marcadores ou proteínas
11 expressas para definir e caracterizar completamente as CT neurais indiferenciadas.
12 Ainda hoje elas são primeiramente isoladas e cultivadas “in vitro” como neuroesferas
13 que flutuam livres em superfícies não aderentes em presença de fatores mitogênicos
14 como FGF-2 (Fator de crescimento de fibroblastos) entre outros (GRITTI et al., 2002).
15 Contudo as neuroesferas não são homogêneas; elas consistem em células
16 heterogêneas em uma superfície continua de marcadores e fatores de transcrição que
17 mudam ao longo do tempo em cultura (SINGEC et al., 2007). Tem sido demonstrado
18 que células tronco neurais indiferenciadas de fetos podem ser mantidas “in vitro” por
19 mais de 6 meses e esses neurônios se diferenciam preferencialmente em neurônios
20 de linhagem gabaérgica (JAIN et al., 2003).

21 Transplantes de ambas as CT neurais, adultas ou fetais “in vivo” tem
22 demonstrado poucas complicações tumorigênicas; contudo também tem
23 diferenciação limitada para neurônios maduros de tecidos específicos. O problema é
24 esclarecer que com a curta janela de tempo que se segue durante a indução neural
25 as células possam ser induzidas a se diferenciar em linhagens neurais específicas
26 (BOUHON; KATZ, 2005). A recuperação funcional seguinte ao transplante de CT
27 neurais é provavelmente devido aos efeitos neuroprotetores de células implantadas
28 maior que as repostas pelos neurônios perdidos (DIANA; SILVA, 2009).

29

30

31

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Ensaio experimental pré-clínico.

3.2 ANIMAIS

O modelo experimental adotado foi o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia , fêmeas com peso médio de 2,8 Kg, devido a praticidade de manejo, observação e manutenção, além de ser uma espécie com proporções anatômicas mais próximas dos cães e gatos do que espécies de menor porte de laboratório, além do que a quantidade de trabalhos com esta espécie em relação ao objetivo deste trabalho, apresenta um número bem menor de publicações conclusivas.

Os animais foram mantidos em condições de alimentação, iluminação e higiene adequadas. Na avaliação pré-operatória os animais foram inicialmente pesados e avaliados quanto ao seu estado geral de saúde através de exame clínico a fim de certificar a higidez dos mesmos.

A pesquisa experimental foi aprovada pelo Comitê de Experimentação e Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, protocolo número 179, em 18 de dezembro de 2012.

Foram utilizados 35 (trinta e cinco) animais, divididos em 5 grupos. Em todos os grupos, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução da lesão medular. A diferença entre cada grupo está no tipo de terapia celular utilizada no período pós operatório, como descrito a seguir:

- Grupo 1 (G1): controle- somente indução da lesão medular.
- Grupo 2 (G2): células mononucleares derivadas de medula óssea (MNMOs) – 8hs pós cirúrgico.

- 1 • Grupo 3 (G3): células mononucleares derivadas de medula óssea (MNMOs)
2 – 7 dias pós cirúrgico.
- 3 • Grupo 4 (G4): células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea
4 (CMMOs) – 8hs pós cirúrgico.
- 5 • Grupo 5 (G5): células- tronco mesenquimais derivadas de medula óssea
6 (CMMOs) – 7 dias pós cirúrgico.

7 Ao longo da realização do experimento ocorreram 8 óbitos de animais no pós-
8 operatório; 7 antes da 1ª. avaliação clínica e 1 que foi avaliado por duas semanas.
9 Todos os óbitos ocorreram em função de infecções particularmente do sistema
10 urinário. Todas as perdas foram repostas a fim de manter o número de animais por
11 grupo.

13 3.3 LOCAL DO EXPERIMENTO

14
15 O experimento foi realizado no Hospital do Centro de Ciências Tecnológicas e
16 Agropecuárias (CCTA) e na Unidade de Experimentação Animal em cooperação com
17 o Laboratório de Biologia de Células e Tecidos do Centro de Biociências e
18 Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
19 (UENF), localizados no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de
20 Janeiro, Brasil, América do Sul, latitude de - 21° 45' 15", longitude de - 41° 19' 28" e
21 altitude de 13 metros acima do nível do Oceano Atlântico.

23 3.4 PROTOCOLO ANESTÉSICO E PÓS-ANESTÉSICO

24
25 O protocolo anestésico tanto para os procedimentos cirúrgicos quanto para
26 coleta de medula óssea consistiu de medicação pré anestésica com associação de
27 cloridrato de cetamina (25 mg.kg⁻¹) e midazolan (3,0 mg.kg⁻¹), por via intramuscular.
28 Foi realizada a canulação da veia marginal do pavilhão auricular esquerdo com o uso
29 de um cateter 24 Gauge (24G), após antissepsia da região com álcool 70°. A indução
30 e manutenção anestésica foram realizadas por meio de máscara facial em circuito

1 semi aberto com vaporização de isoflurano em oxigênio 100% a 2 l/min. Os
2 parâmetros cardíacos e respiratórios foram monitorados ao longo de todo
3 procedimento cirúrgico

4 Após a recuperação anestésica os animais foram novamente avaliados quanto
5 ao estado neurológico, a fim de avaliar a eficácia da técnica em gerar lesão medular.
6 Todos os animais receberam terapia antimicrobiana com a administração, por via
7 intramuscular, de enrofloxacin na dose de 5 mg.kg⁻¹ durante 7 (sete) dias e cloridrato
8 de morfina como medicação analgésica na dose de 1 mg.Kg⁻¹, a cada 8 horas, durante
9 4 dias.

10

11 3.5 MODELO DE LESÃO MEDULAR

12

13 O modelo experimental de indução de lesão da medula espinhal foi o descrito
14 por Vanický I. et al. (2001), por ser simples, facilmente reproduzível, ter baixo custo e
15 ser menos cruento que os modelos de injúria por trauma ou substâncias químicas.
16 Utilizou-se a técnica de laminectomia dorsal, com os animais posicionados em
17 decúbito externo, para acessar o cordão espinhal, por permitir uma boa visualização
18 do canal medular, e fácil introdução do cateter de Fogarty 4F (Edwards®) (Figura 4).

19

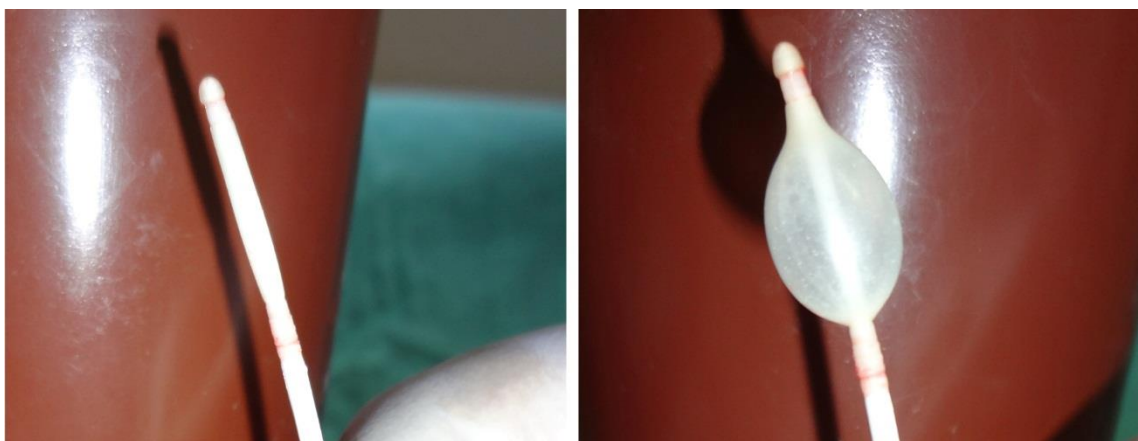
20

21

22

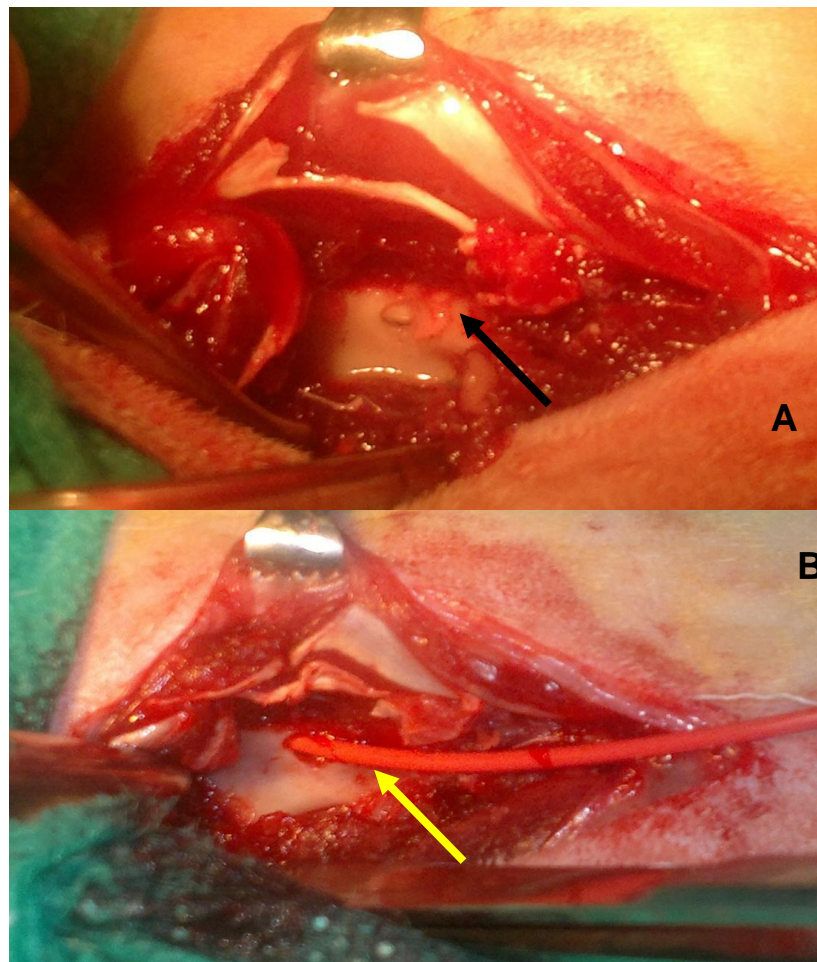
23

24



25 **Figure 4:** Fotografias mostrando o cateter de Fogarty com o balão inflável vazio (A)
26 e cheio (B).

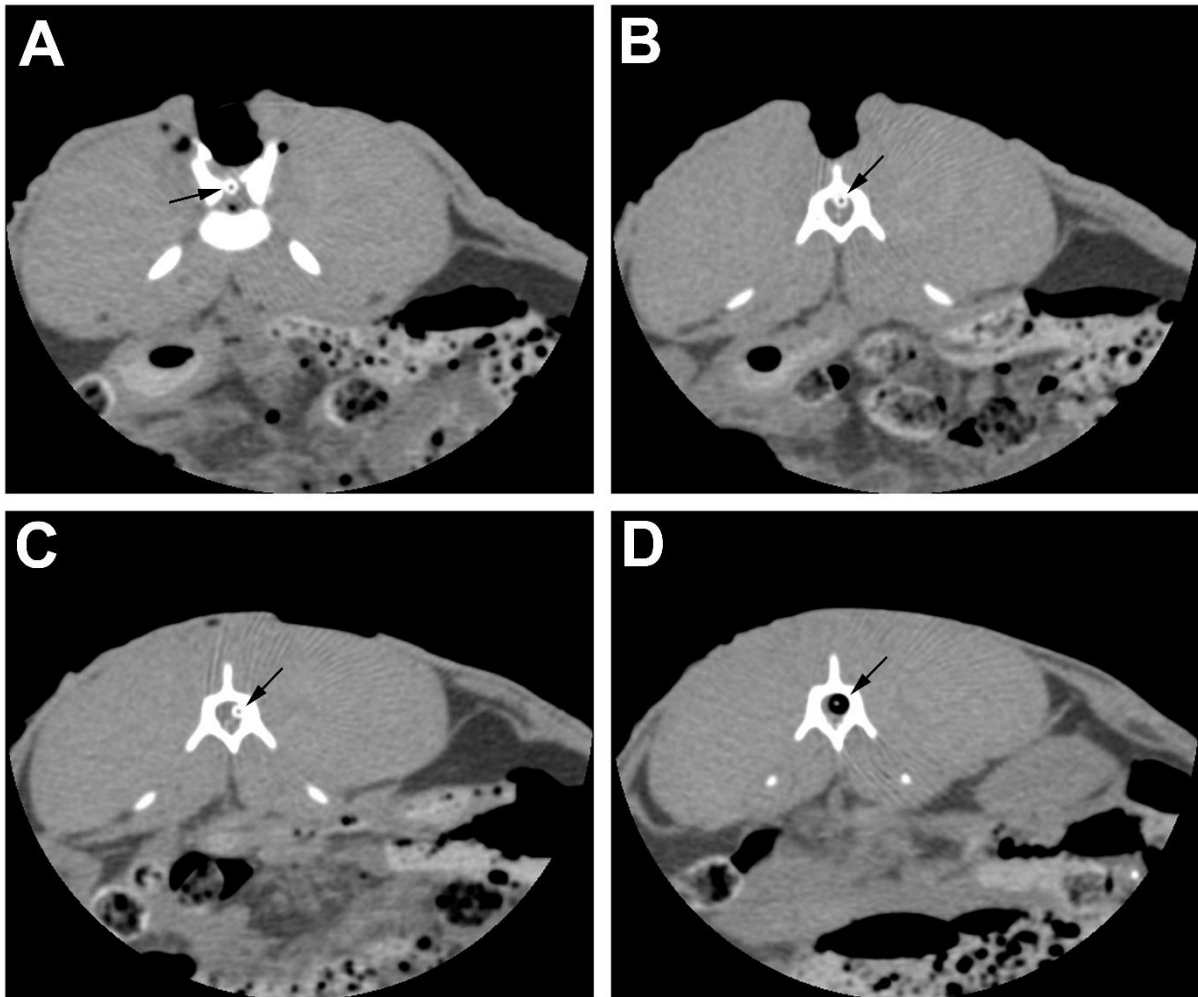
1 A laminectomia dorsal é a remoção cuidadosa dos processos espinhosos
2 dorsais, lâminas e porções dos pedículos para expor a face dorsal do cordão espinhal
3 e das raízes nervosas, com auxílio de uma broca dentária em carboneto de tungstênio
4 nº 8 acoplada a um micromotor de suspensão. Nesse estudo a técnica foi realizada
5 entre as vértebras L2 e L4 e remoção do processo espinhoso dorsal de L3, local onde
6 o cateter lentamente e dorsalmente ao cordão espinhal foi introduzido até a altura da
7 vértebra T13. Foi utilizado 1(um) centímetro cúbico de ar para inflar o balonete, e
8 permaneceu inflado durante 10 (dez) minutos, após esse tempo realizou-se a
9 desinsuflação, remoção do cateter e fechamento do local de acesso (Figura 5).



23 **Figura 5:** Coluna vertebral de coelho. Laminectomia dorsal do processo espinhoso de
24 L3, seta preta (A); Introdução do cateter no canal medular, seta amarela (B). Fonte:
25 Arquivo pessoal, 2014.

1 Para a confirmação do correto posicionamento do cateter e observação do
2 preenchimento total do canal medular pelo balonete, realizou-se o exame de
3 tomografia computadorizada em um animal (Figura 6).

4



5

6 **Figure 6:** Imagens tomográficas em plano axial de um Coelho demonstrando o
7 posicionamento do cateter de Fogarty dentro do canal medular. (A) Imagem da
8 inserção do cateter (seta) na vertebra L3. (B and C) Imagens demonstrando o
9 posicionamento do cateter (seta) em deslocamento cranial. (D) Imagem
10 demonstrando o balonete insuflado (seta) dentro da vertebra. Notar que o volume do
11 balonete insuflado ocupa parte significativa do canal medular promovendo
12 compressão do cordão medular. Fonte: Arquivo pessoal, 2014.

13

3.6 PROTOCOLO DE COLETA E PROCESSAMENTO E OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES E MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA

A região do trocater maior dos fêmures, foram preparadas para procedimento cirúrgico asséptico. Com os animais sob anestesia geral, uma incisão de pele foi feita sobre o trocater maior dos fêmures. Com agulha de biópsia de medula óssea tipo Jamshidi (Figura 7), penetra-se a córtex do osso até alcançar a região metafisária. Uma seringa, contendo 10.000 UI de heparina é acoplada a agulha e procede-se o aspirado da medula óssea.

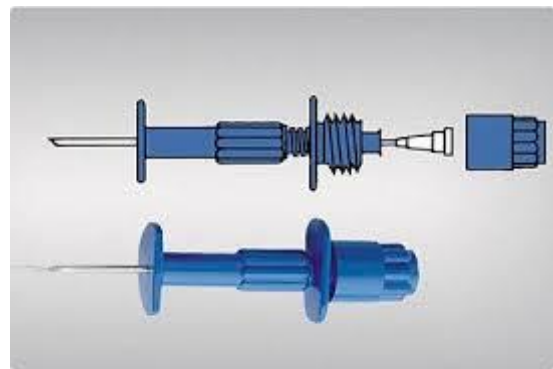
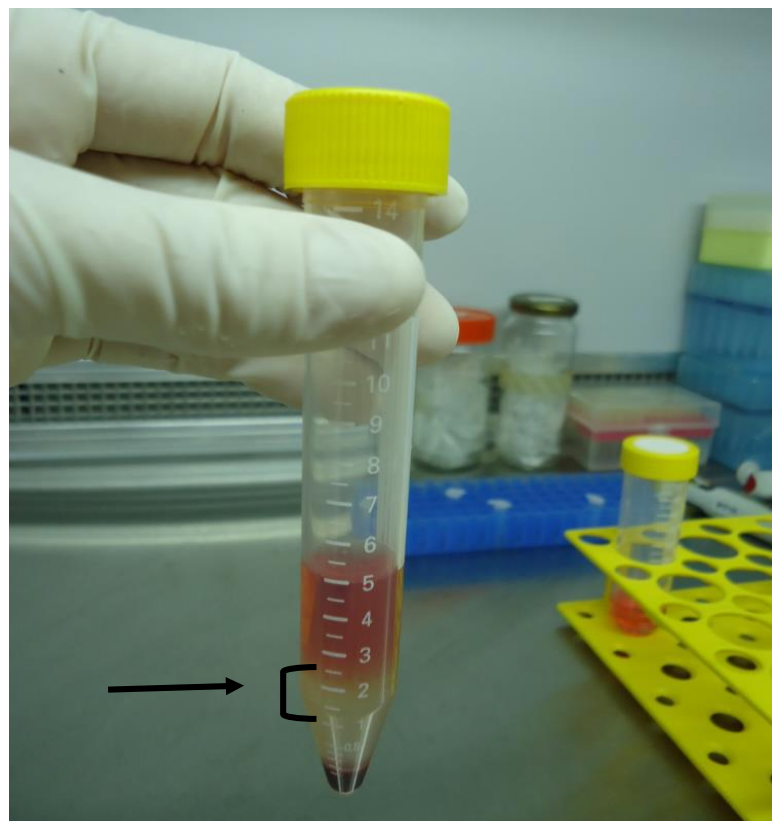


Figura 7. Agulha de Biópsia de Medula Óssea Tipo Jamshidi. Fonte: <http://www.hospiline.com.br/DetalhesProduto.aspx?id=2>.

A medula óssea coletada foi colocada em tubos estéreis de 15 ml, dissociados mecanicamente e centrifugados por 5 minutos (400 x g, velocidade de 8,5 rpm, 25 °C). Recolheu-se o precipitado e, novamente, este foi suspenso em meio de cultura (2 ml de DMEM/F12 sem soro) e submetido à centrifugação (400 x g, velocidade de 8,5 rpm, 25 °C) em 2 ml de Histopaque 1083, durante 30 minutos.

Para isolamento das células mononucleares da medula óssea, entre as quais estão as células tronco mesenquimais, foram retiradas as células presentes no anel formado entre o Histopaque 1083 e o DMEM/F12 sem soro (Figura 8). Essas células foram colocadas em um tubo com 3 ml de PBS 10 mM pH 7,4 para realização da a

1 primeira lavagem, ressuspensão e centrifugação por 5 min (400 x g, velocidade de 8,5
2 rpm, 25 °C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 3 ml de PBS
3 para uma segunda lavagem, ressuspensão das células, centrifugação nas mesmas
4 condições e descarte do sobrenadante. Mais uma lavagem foi efetuada, e após o
5 descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 ml de PBS. As
6 células foram contadas em câmara de Neubauer e foi feita a avaliação simultânea da
7 viabilidade celular pela coloração do azul de tripan (4%) o que permitiu que as células
8 mortas, que ficam coradas, não fossem contadas. Ao final da contagem, foi feito um
9 cálculo para identificar o volume de solução que continha 30 milhões ($3,0 \times 10^7$) de
10 células. Este volume foi calculado com a seguinte fórmula: n° de células x diluição x
11 $10^4 / 4$. Essas foram as células mononucleares utilizadas para transplante nos animais
12 dos grupos G2 e G3.



13

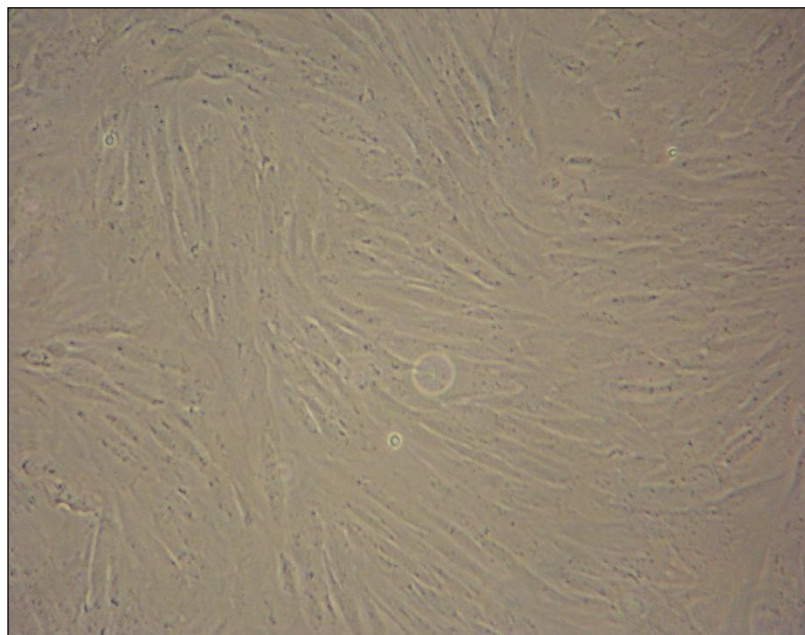
14 **Figura 8.** Foto do frasco contendo a Fração de Células Mononucleares da Medula
15 Óssea (MNMOs) após centrifugação e isolamento por gradiente de densidade com
16 Histopaque. As MNMOs se encontram indicadas com a seta, entre o DMEM F12 e
17 Histopaque 1083. Fonte: Coelho B. P, 2014.

18

1 A partir destas mesmas células mononucleares obtivemos as células
2 mesenquimais através do cultivo em garrafas de cultivo mantidos em estufa com 5%
3 CO₂, a 37° C e 95% de umidade. O meio de cultivo foi trocado 48 horas após o
4 plaqueamento inicial para a remoção de células não aderentes ao frasco de cultivo,
5 ou seja as células da linhagem hematopoética ou mortas.

6 As culturas celulares (Figura 9) foram refeitas quando alcançavam 80 a 90% de
7 confluência o que ocorria em torno de 7 a 10 dias após início do cultivo. O
8 desprendimento das células dos frascos foi feito utilizando 0,25% tripsina/EDTA
9 estando prontas para serem repassadas para outros frascos de cultivo o que
10 denominamos de 1^a. Passagem (P1). Tal procedimento se repetiu por mais 3 vezes
11 quando as células em cultivo alcançavam a confluência desejada sendo então
12 utilizadas para administração no animais dos grupos G3 e G4 estando então na sua
13 4^a. Passagem (P4).

14



15

16 **Figura 9.** Imagem do cultivo de células mesenquimais em confluência. Fonte: Arquivo
17 pessoal, 2014.

18

19

1 3.7 PROTOCOLO DE TERAPIA CELULAR

2

3 Após a indução da lesão medular espinhal, realizou-se a terapia proposta
4 utilizando-se para a aplicação das células ou solução salina a veia marginal do
5 pavilhão auricular esquerdo, de acordo com o grupo, a saber:

- 6 • Grupo 1) Controle, que recebeu 1ml de solução salina 8 horas e 7dias pós-
7 cirurgia.
- 8 • Grupo 2) Tratado, que recebeu 1ml contendo 3×10^7 células MNMOs, 8
9 horas pós-cirurgia.
- 10 • Grupo 3) Tratado, que recebeu 1ml contendo 3×10^7 células MNMOs, 7dias
11 pós-cirurgia.
- 12 • Grupo 4) Tratado, que recebeu 1ml contendo 3×10^6 CMMOs, 8 horas pós-
13 cirurgia.
- 14 • Grupo 5) Tratado, que recebeu 1ml contendo 3×10^6 CMMOS, 7dias pós-
15 cirurgia.

16

17 3.8 CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO MOTORA E SENSITIVA

18

19 Cada animal foi filmado durante 4 a 5 minutos, 1 vez por semana durante 4
20 semanas sendo a 1ª filmagem feita 7 dias após o transplante das respectivas CT ou
21 administração de solução salina (grupo controle), sendo sacrificados ao final desse
22 período. Posteriormente os vídeos foram analisados e avaliados de maneira cega por
23 6 avaliadores médicos veterinários envolvidos nas áreas de estudos da cirurgia, dor,
24 anestesia e analgesia que preencheram formulário, pontuando os vídeos de cada
25 animal de acordo com o score da tabela (Tabela 1) , que é uma adaptação da escala
26 de Tarlov (1954).

27

28

29

1 **Tabela 1.** Critérios de avaliação motora e sensitiva dos membros pélvicos.

GRAU	CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO MOTORA E SENSITIVA DOS MEMBROS PÉLVICOS
0	Nenhum movimento voluntário ou percepção de dor
1	Perceptível movimento voluntário sem percepção de dor
2	Perceptível movimento voluntário com percepção de dor
3	Boa movimentação voluntária com percepção de dor
4	Habilidade de levantar e/ou caminhar com percepção de dor

2

3 **3.9 SACRIFÍCIO**

4

5 Os animais foram sacrificados quatro semanas após a terapia celular. Foram
 6 utilizados cloridrato de cetamina (25mg.kg⁻¹) associado a midazolam (3,0mg.kg⁻¹),
 7 ambos por via intramuscular seguida da administração de tiopental sódico a 2,5% em
 8 *BOLUS* e 1ml de cloreto de potássio 20% intravenoso até a parada cardiorrespiratória,
 9 respeitando os princípios éticos da experimentação animal. Após o sacrifício foi
 10 realizada imediatamente a necropsia e coleta do sistema nervoso central para
 11 posterior avaliação histopatológica.

12

13 **3.10 AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICA**

14

15 Imediatamente após o sacrifício, o sistema nervoso central foi coletado por
 16 completo e frações do encéfalo, e cada trecho do cordão medular (cervical, torácico,
 17 lombar e sacral) de cada animal foi identificado e fixado em solução de formol
 18 tamponado neutro a 10%. Estas amostras foram encaminhadas ao Setor de
 19 Morfologia do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal/UENF, dispostas em
 20 histossetes plásticos para posterior processamento. O processamento consistiu-se

1 em desidratação, diafinização e parafinização do tecido analisado. O material foi
2 incluído em blocos de parafina e foram realizados cortes histológicos em micrótomo
3 semi 10 automático (5m). As amostras foram coradas em hematoxilina-eosina para
4 posterior montagem das lâminas que foram analisadas sob microscopia óptica, onde
5 avaliaram-se as características morfológicas celulares e padrão tecidual da lesão para
6 fins de diagnóstico.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

1

2

3 Foi realizado um estudo das fontes de variação (grupo/tratamento) aplicando
4 análise de variância (ANOVA), utilizando o programa The Statistical Analysis System
5 4 (SAS), sendo no tempo 7 ANOVA com pós teste de Tukey. Nos demais tempos
6 ANOVA de dois fatores com medida repetida (dia pós lesão e tratamento), havendo
7 interação entre fatores.

8 O dado ligado foi o tempo e o desdobramento foi feito dentro de cada tempo
9 através de ANOVA e teste de Tukey.

10

11

12 ∴

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

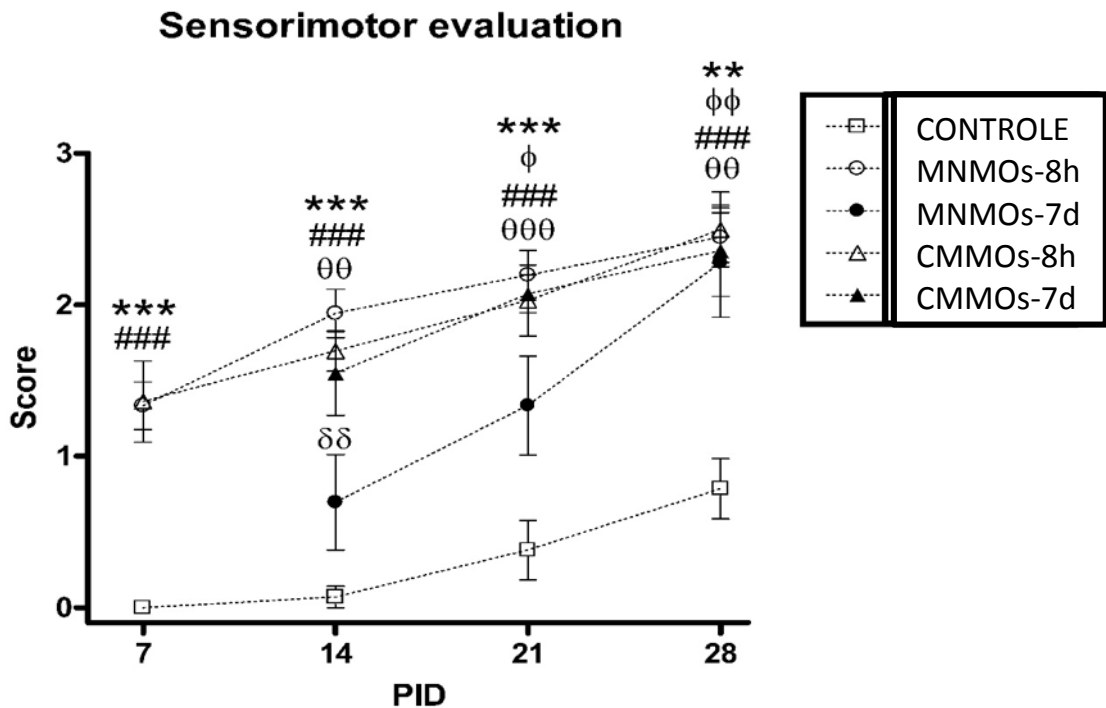
5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO SENSORIAL E MOTORA

O gráfico mostra os resultados da avaliação sensorial e motora. No momento 7 dias pós tratamento houve diferença significativa entre os grupos, mas os grupos tratados com células mononucleares diferiam do grupo controle mas não diferiam entre si.

No momento 14 dias pós tratamento, todos os grupos tratamentos diferiram do grupo controle exceto o grupo tratado com células mononucleares 7 dias pós lesão, mas diferia dos demais inclusive do grupo tratado com células mononucleares 8 horas pós lesão. Nos tempos 21 e 28 dias pós lesão, todos os grupos diferiam do grupo controle mas não diferiam entre si. Como resultado podemos interpretar que o tratamento do grupo G3 demonstrou melhora da atividade sensorial e motora mais tardiamente, alcançando o mesmo resultado final dos demais grupos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com células mononucleares e mesenquimais e não houve diferença significativa com relação aos tempos de tratamento em relação ao resultado final (Gráfico 1).

1 **Gráfico 1:** Análise estatística das avaliações dos vídeos.



2

3 **Legenda:** *- comparação entre o grupo MNMOs-8h e grupo controle; φ - comparação entre
 4 o grupo MNMOs-7d e grupo controle; # - comparação entre o grupo CMMOs-8h e grupo
 5 controle; θ - comparação entre o grupo CMMOs-7d e grupo controle; δ - comparação entre
 6 BMMC-8h and BMMC-7d groups. 01 símbolo = $p < 0.05$; 02 símbolos = $p < 0.01$; 03 símbolos =
 7 $p < 0.001$; Teste deTukey. Quadrados, círculos e triângulos representam média±EPM. Fonte:
 8 Arquivo pessoal, 2014.

9

10 5.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

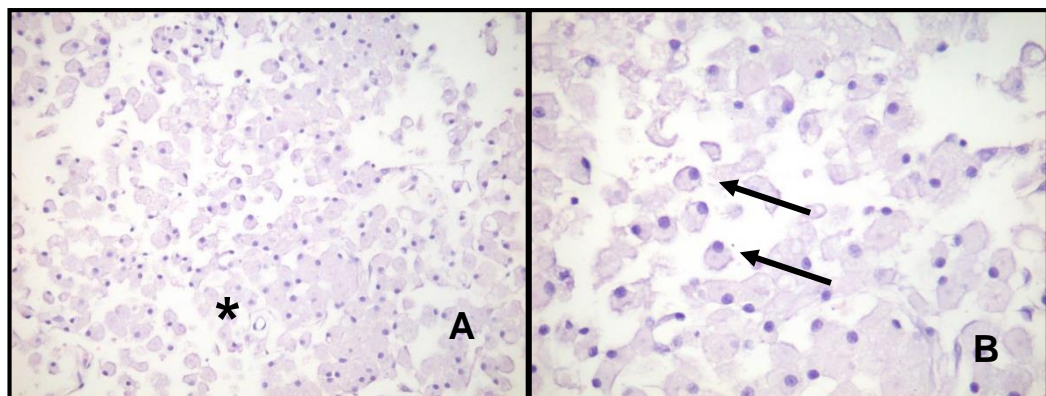
11

12 Os achados histopatológicos demonstraram alterações características de um
 13 processo de lesão medular espinal onde a isquemia provocada pelo processo
 14 compressivo levou ao dano da medula espinal provocando degeneração do tipo
 15 valeriana onde pudemos evidenciar mielomalácia com presença de célula Gitter na

1 medula espinhal (figura 10) e no canal ependimário (figura 11), além de mineralização
2 e fribrose das meninges (figuras 12 e 14) ; bem como infiltrado inflamatório
3 mononuclear ao redor de vasos sanguíneos, manguito perivascular (figura 13) e
4 cromatólise (figura 15).

5 Todos os achados correram em todos os grupos de forma retrógrada, ou seja
6 posterior a lesão, nas regiões medulares lombares e sacrais porém não foi observada
7 diferença na intensidade ou qualidade das lesões, o que impossibilita dizermos que
8 houve diferença entre os grupos após o tratamento.

9

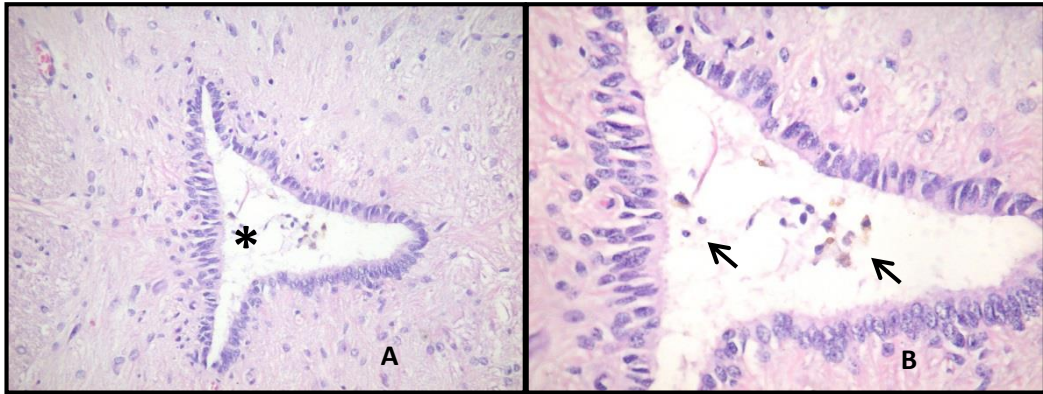


10

11 **Figura 10.** Fotomicrografia de medula espinhal torácica de coelho. **(A)** Numerosos
12 macrófagos espumosos (células Gitter) fagocitando lípidos provenientes da
13 mielomalácia (*). H/E, obj. 10X. **(B)** Ampliação da imagem anterior onde podem ser
14 evidenciados os macrófagos espumosos associados a mielomalácia (setas). H/E,
15 objetiva 20X. Fonte: Arquivo pessoal, 2014.

16

17



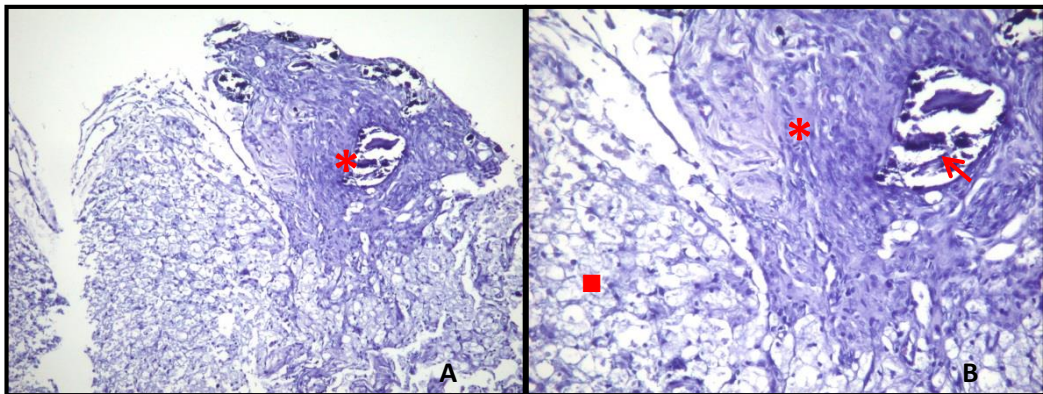
1

2 **Figura 11.** Fotomicrografia de medula espinhal lombar de coelho. **(A)** Observam- se
 3 macrófagos no interior do canal endimário (*). H/E, obj. 20X. **(B)** Ampliação da
 4 imagem anterior onde podem ser observados macrófagos contendo hemossiderina
 5 em seu citoplasma (setas). H/E, obj. 40X. Fonte: arquivo pessoal, 2014.

6

7

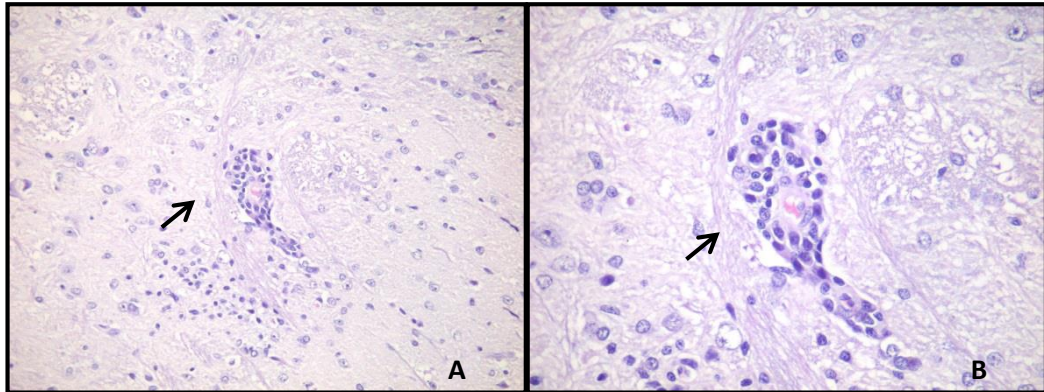
8



9

10 **Figura 12.** Fotomicrografia de medula espinhal lombar de coelho. **(A)** Mineralização
 11 de meninge acentuadamente espessada (*). H/E, obj. 10X. **(B)** Aumentou da imagem
 12 anterior onde pode ser observado a mineralização (seta) a fibrose da meninge (*) e
 13 numerosos macrófagos espumosos (■). H/E, obj. 20X. Fonte: arquivo pessoal, 2014.

14



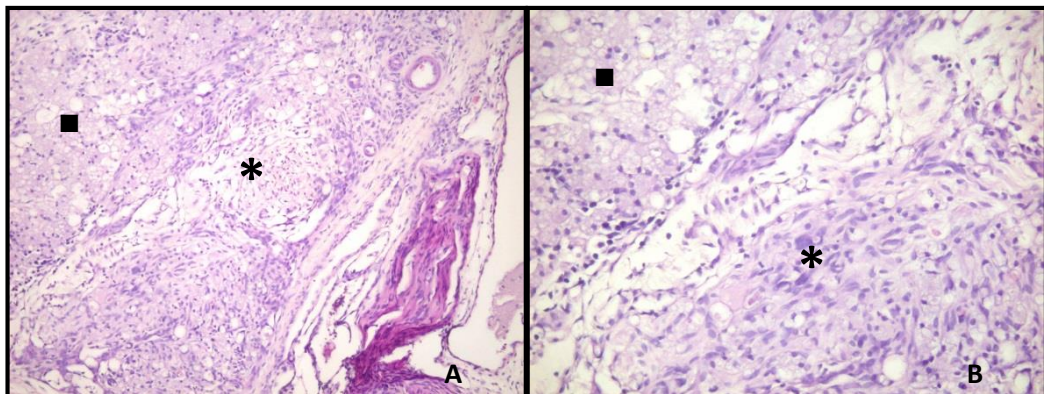
1

2 **Figura 13.** Fotomicrografia de medula espinhal sacral de coelho. **(A)** Infiltrado
 3 inflamatório mononuclear ao redor de vaso sanguíneo (seta). H/E, obj. 10X. **(B)**
 4 Ampliação da imagem anterior onde podem ser vistos numerosos linfócitos ao redor
 5 de um capilar (manguito perivascular) (seta). H/E, obj. 20X. Fonte: arquivo pessoal,
 6 2014.

7

8

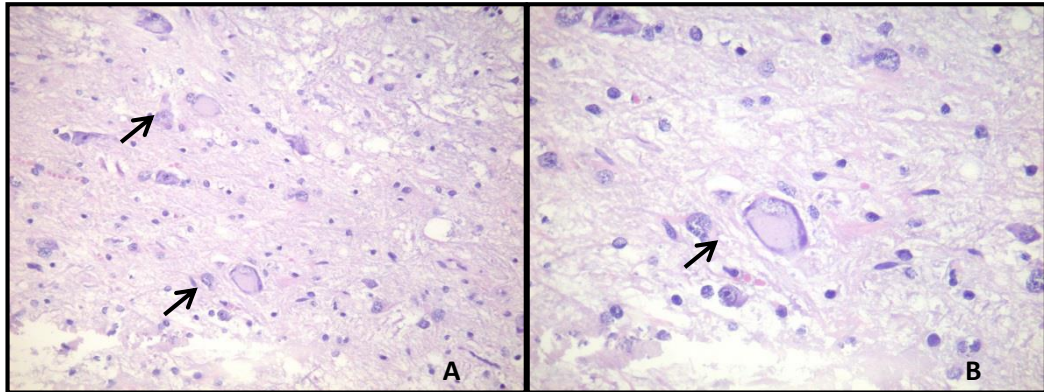
9



10

11 **Figura 14.** Fotomicrografia de medula espinhal sacral de coelho. **(A)** Observa- se
 12 acentuada fibrose das meninges (*) e numerosos macrófagos espumosos (■). H/E,
 13 obj. 10X. **(B)** Ampliação da imagem anterior onde podem ser observados numerosos
 14 fibroblastos permeados por moderada quantidade de matriz colagenosa (*) e
 15 macrófagos espumosos (■). H/E, obj. 20X. Fonte: arquivo pessoal, 2014.

16



1

2 **Figura 15.** Fotomicrografia de medula espinhal lombar de coelho. **(A)** Observam-se
3 numerosos neurônios demonstrando cromatólise central (setas). H/E, obj. 10X.
4 Ampliação da imagem anterior onde pode ser observado cromatólise central e núcleo
5 periférico (seta) (comparar com neurônio normal em imagem superior a direita). H/E,
6 obj. 20X. Fonte: arquivo pessoal, 2014.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

6 DISCUSSÃO

O modelo experimental de lesão medular espinhal em coelhos através da insuflação do balonete do cateter de Fogarty, usado em humanos para embolectomia arterial, mostrou-se adequado, sendo uma técnica de simples aplicabilidade, segura e eficaz, produzindo a paraplegia com perda sensorial e motora semelhante a relatada por Tarlov (1954), Jim et al. (2007) e Vanicky et al. (2001) representando um método adequado para a avaliação da lesão medular espinhal aguda. Cabe ressaltar que cada espécie animal utilizada exige um calibre de cateter diferente de acordo com o diâmetro do canal medular. Jim et al. (2007) usaram cateteres 3-F em cães e Vanicky et al. (2001) cateteres 2-F em ratos.

Jim et al (2007) utilizou esse mesmo modelo experimental em suas pesquisas, alcançando bons resultados em relação a repetibilidade e uniformidade na produção da lesão em cães e Vanicky et al. (2001) em ratos adultos. De acordo com Ignatiadis et al. (2007) a escolha apropriada do modelo animal é crucial em pesquisas experimentais de lesões nervosas, estando de acordo também com Colomé et al. (2008) e Gomes (2008), os quais ressaltam as vantagens de baixo custo com a manutenção e facilidade de manejo de coelhos experimentais. Além disso a utilização de coelhos permitiu a coleta de células autólogas de medula óssea, anulando assim o risco de reações imunológicas e, conseqüentemente, rejeição destas pelo organismo, o que pode ocorrer quando da utilização de células heterólogas (HU et al., 2007; GOMES, 2008). Por todas estas razões, consideramos que coelhos da raça Nova Zelândia albinos (*Oryctolagus cuniculus*) são uma boa opção de modelo experimental para estudos de lesões medulares à semelhança de vários outros pesquisadores nesta área (IGNATIADIS et al., 2007; COLOMÉ et al., 2008; ZHANG et al., 2008).

A escolha dos tempos de aplicação da terapia celular em 8 horas ou 7 dias após a indução da lesão teve por objetivo atingirmos as fases imediata e aguda do processo inflamatório, onde a ação moduladora das células transplantadas poderiam melhor intervir na liberação de substâncias pró e antiinflamatórias, conforme sugere também Siddiqui et al. (2014). O presente experimento demonstrou ainda que os tratamentos em tempos diferentes obtiveram igual eficácia na recuperação

1 neurológica, evidenciando que a janela terapêutica pode ser de pelo menos uma
2 semana após a lesão, como demonstrado no gráfico 1 onde tanto os animais tratados
3 no dia da lesão quanto os que só receberam tratamento 7 dias pós-lesão obtiveram
4 melhora da avaliação clínica não havendo diferença estatística significativa entre os
5 grupos .

6 Chen et al. (2004) relata que a terapia celular com células tronco
7 mesenquimais possui a função de gerar a revascularização em áreas isquêmicas,
8 diminuindo a evolução da necrose tecidual. Em nosso trabalho não foi possível
9 observar tais eventos relacionados a revascularização tecidual.

10 Os resultados encontrados em nossa pesquisa não revelaram nenhum grau de
11 reestruturação do tecido medular lesado, como processos de reestruturação ou
12 regeneração neurais, gliais ou mielínicas, entretanto, não podemos afirmar que
13 alterações mais discretas não tenham sido promovidas pelos dois tipos de tratamento
14 utilizados. Para tal, futuros estudos com a utilização de marcadores específicos para
15 tipos celulares e de componentes da matriz extracelular são necessários para
16 esclarecer esta questão.

17 Akiyama et al. (2002) por exemplo, trabalhando com células mononucleares
18 em ratos em modelos de lesão medular espinhal e acidente vascular encefálico,
19 utilizando técnicas mais específicas e refinadas (detecção de reação de produção de
20 β -galactosidase) observou diferentes graus de remielinização do tecido nervoso nos
21 animais que receberam células mononucleares o que não ocorreu com os animais
22 controle. A observação deste tipo de regeneração da mielina requer uso de
23 tecnologias que envolvem engenharia genética, grande conhecimento e alto custo.

24 Em nosso experimento todos os animais que receberam terapia celular,
25 independente do tipo celular e do tempo, apresentaram melhora significativa na
26 avaliação sensorial e motora, evoluindo no score de pontuação ao longo das semanas
27 pós-operatório, quando comparados aos animais controles. No grupo controle
28 nenhum animal apresentou melhora estatisticamente significativa e entre os
29 avaliadores foi o grupo com maior homogeneidade na pontuação obtida pelos animais.
30 Esta observação reforça os achados de diversos autores como Braga-Silva et al.
31 (2006) e Sampaio et al. (2013) que demonstram a vantagem no uso dessas células
32 na fase aguda da lesão medular espinhal.

1 Vários estudos, demonstram que a terapia celular apresenta vantagens na
2 recuperação da atividade neural, quando comparados aos indivíduos que não a
3 receberam em lesões tanto de encéfalo quanto da medula espinhal (CHEN et al.,
4 2007; GIRALDI-GUIMARÃES et al., 2009; MENDEZ-OTERO et al., 2009; SAMPAIO
5 et al., 2013; COELHO; GIRALDI-GUIMARÃES, 2014), sugerindo que as células
6 mononucleares e mesenquimais derivadas da medula óssea interferem na produção
7 e liberação de fatores neurotróficos e modulando o processo inflamatório
8 predominantemente na fase aguda do processo, promovendo um meio mais
9 favorável, contribuindo para a aceleração da reorganização do tecido nervoso (CHEN
10 et al.,2007).

11 A utilização da terapia celular na fase imediata e aguda da lesão medular
12 espinhal, segundo Valina et al (2007), seria o melhor momento, já que o edema
13 intersticial as alterações da permeabilidade vascular, facilitando a distribuição das
14 células aplicadas através da barreira hematoespinhal, por isso a importância da
15 aplicação precocemente, no entanto em nosso experimento foi possível constatar que
16 no período que compreende o dia da lesão até 7 dias pós lesão, a eficácia da terapia
17 celular foi satisfatória dentro da análise estatística realizada e corrobora com Siddiqui
18 et al. (2014) que considera o período que se estende de 14 dias até 6 meses pós lesão
19 como período intermediário, favorável as ações da terapia celular.

20 Alguns autores como Souza et al. (2010) relatam que o diâmetro das células
21 tronco mesenquimais é maior que o de outros tipos de células tronco, portanto a maior
22 permeabilidade da barreira hematoespinhal facilita a chegada dessas células ao sítio
23 no sistema nervoso central.

24 A análise dos vídeos foi feita baseando-se nas recomendações de Molina et
25 al. (2004) e a metodologia de utilização de 6 avaliadores num experimento cego, onde
26 todos analisaram todos os animais do experimento sem saber a qual grupo pertencia
27 aquele animal, aumentou o grau de confiabilidade dos resultados não havendo
28 discrepâncias nas pontuações atribuídas entre os avaliadores.

29 Colomé et al. (2008), avaliaram os animais somente 30 dias após o
30 procedimento cirúrgico, porém Ignatiadis et al. (2007), realizou avaliações seriadas
31 como o que fizemos também em nosso experimento com o intuito observar mais
32 detalhadamente a evolução clínica dos animais e não só ao término de um período

1 mais amplo. Portanto, esta análise nos animais do presente estudo, apesar de
2 subjetiva, apresentou grande importância, pois permitiu observar e comparar a
3 evolução clínica dos grupos terapia com o grupo controle.

4 Os achados histológicos revelaram que a indução da lesão medular espinal
5 produziu um processo inflamatório agudo com infiltrado mononuclear onde observa-
6 se mielomalácia caracterizada por presença células Gitter que são uma
7 combinação de micróglia macrófagos ou monócitos que podem também ser
8 denominadas de grânulo espumosas e este aspecto espumoso à visualização se
9 deve basicamente a grande digestão de restos celulares e lípidos proveniente da
10 degeneração mielínica. A presença de células Gitter e infiltrado mononuclear estão de
11 acordo com dados encontrados por Colomé et al. (2008) que coincidem com os de
12 outros autores (LUCAS et al., 2006; PROFYRIS et al., 2004).

13 O tecido nervoso é desprovido de fibroblastos, no entanto as meninges
14 possuem células capazes de, diante de um processo lesional, produzirem tecido
15 conjuntivo fibroso levando a formação de fibrose das meninges e cromatólise.
16 Posterior ao processo de fibrose e morte celular pode ocorrer, associado a fibroplasia
17 das meninges (principalmente a pia-mater), um processo de mineralização distrófica
18 que é um acúmulo de minerais sobre uma área de lesão previamente formada. Em
19 nosso experimento pudemos observar todos esses eventos de forma constante assim
20 como Colomé et al. (2008), Chen et al. (2007), Braga-Silva et al. (2006).

21 Os transplantes de células mesenquimais e mononucleares derivadas de
22 medula óssea nas lesões medulares espinhais, tem apresentado resultados distintos
23 em várias pesquisas, o que levanta pertinentes questionamentos na grande maioria
24 dos estudos com relação a diversas variáveis como: tipos celulares utilizados, modelo
25 experimental, vias de administração do transplante celular, etc.. Há portanto, a
26 necessidade de aprimoramento nos novos estudos, das técnicas empregadas para
27 produção das lesões do sistema nervoso, e maior uniformidade das condutas na
28 comparação de resultados.

29

30

31

7 CONCLUSÕES

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

A terapia com células mononucleares e células tronco mesenquimais, ambas derivadas de medula óssea, são igualmente capazes de promover a recuperação funcional nos animais submetidos a lesão medular espinhal produzida por compressão, independentemente dos tempos utilizados neste experimento, sugerindo que o tratamento deste tipo de lesão com as terapias celulares propostas são benéficas na recuperação clínica dos animais.

De acordo com a análise histopatológica qualitativa da lesão, não foi observada diferença entre os grupos, sugerindo que o tratamento não promoveu alteração no processo hitopatológico de forma tão significativa a ponto de ser visualizada pela análise empregada neste experimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

AKIYAMA, Y.; RADTKE, C.; OSAMU HONMOU O.; D.KOCSIS, J.D. Remyelination of the Spinal Cord Following Intravenous Delivery of Bone Marrow Cells. **Glia**, v.39, n.3, p. 229–236, 2002.

ALISON, M. R.; POULSOM, R.; JEFFERY, R.; DHILLON, A. P.; QUAGLIA, A.; JACOB, J.; NOVELLI, M.; PRENTICE, G.; WILLIAMSON, J.; WRIGHT, N. A. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. **Nature**, v.406, n.6793, p.257, 2000.

ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **Journal of Comparative Neurology**, v.26, p.337–389, 1966.

ARNHOLD, S.J.; GOLETZ, I.; KLEIN, H.; STUMPF, G.; BELUCHE, L.A.; ROHDE, C.; ADDICKS, K.; LITZKE, L.F. Isolation and characterization of bone marrow–derived equine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 10, p. 1095-1105, 2007.

ASHTON, B. A.; ALLEN, T. D.; HOWLETT, C. R.; EAGLESOM, C. C.; HATTORI, A.; OWEN, M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. **Clinical orthopaedics and related research**, v.151, p. 294–307, 1980.

AWAD, H. A.; HALVORSEN, Y. D.; GIMBLE, J. M.; GUILAK, F. Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. **Journal of Tissue Engineering**, v.9, p.1301-1312, 2003.

BAKER, A. H.; SICA, V.; WORK, L. M.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; DE NIGRIS, F.; LERMAN, L. O.; CASAMASSIMI, A.; LANZA, A.; SCHIANO, C.; RIENZO, M. Brain protection using autologous bone marrow cell, metalloproteinase inhibitors, and metabolic treatment in cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3597-3602, 2007.

- 1 BANERJEE, S.; WILLIAMSON, D. A.; HABIB, N.; CHATAWAY, J. The potential benefit
2 of stem cell therapy after stroke: an update. **Vascular Health and Risk Management**,
3 v. 8, p. 569, 2012.
- 4 BAPTISTE, D. C.; FEHLINGS, M. G. Update on the treatment of spinal cord injury.
5 **Progress in Brain Research**, v.161, p.217–233, 2007.
- 6 BARNABE-HEIDEN. R. F.; FRI SEN, J. Stem cells for spinal cord repair. **Cell Stem**
7 **Cell**, v.3, n.1, p.16-24, 2008.
- 8 BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. A review of experimental and clinical treatments
9 for acute spinal cord injury. **Veterinary Medicine**, p.855-866, 2000.
- 10 BERNÁ, G.; QUINTO-LEÓN, T.; ENSEÑAT-WASER, R.; MONTANYA, E.; MARTÍN,
11 F.; SORIA, B. Stem cells and diabetes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 55, p.
12 206-212, 2001.
- 13 BOCCHI, E. A.; FERREIRA, S. M. A. Células tronco no tratamento das doenças
14 cardiovasculares. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, ano
15 XIII, n. 4, p. 1-9, 2005.
- 16 BOLAND, R. A.; LIN, C. S.; ENGEL, S.; KIEMAN, M. C. Adaptation of motor function
17 after spinal cord injury: novel insights into spinal shock. **Brain**, v. 134, n.2, p.495-505,
18 2011.
- 19 BORLONGAN, C. V.; GLOVER, L. E.; TAJIRI, N.; KANEKO, Y.; FREEMAN, T. B. The
20 great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain:
21 therapeutic implications for stroke and other neurological disorders. **Progress in**
22 **Neurobiology**, v. 95, n. 2, p. 213-228, 2011.
- 23 BORLONGAN, C. V.; GLOVER, L. E.; SANBERG, P.; HESS, D. C. Permeating the
24 blood brain barrier and abrogating the inflammation in stroke: Implications for stroke
25 therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 25, p. 3670, 2012.
- 26 BOTELHO, R.V.; DANIEL, J.W.; BOULOSA, J.L.R. Efetividade da metilprednisolona
27 na fase aguda do trauma raquimedular - Revisão sistemática dos ensaios clínicos
28 randomizados.**Revista da Associação Médica Brasileira**. vol.55 no.6, 2009

- 1 BOUHON, I. A.; KATO, H.; CHANDRAN, S.; ALLEN, N. D. Neural differentiation of
2 mouse embryonic stem cells in chemically defined medium. **Brain Research Bulletin**,
3 v.68, p.62–75, 2005.
- 4 BRAGA-SILVA, J.; GEHLEN, D.; ROMAN, J. A.; MENTA, C.; ATKINSON, E; A.;
5 MACHADO, D. C.; VIEZZER, C.; BARBOSA, G. L.; BAES, C. V. W.; SILVA, V. D.;
6 COSTA, J. C. C. Efeito das células tronco adultas da medula óssea e do plasma rico
7 em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de
8 defeito agudo em nervo periférico de rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n. 5, p.
9 273-275, 2006.
- 10 BRAUER, C.; JAMBROSZYK, M.; TIPOLD, A. Metabolic and toxic causes of canine
11 seizure disorders: A retrospective study of 96 cases. **The Veterinary Journal**, v.187,
12 l.2, p.272-275, 2011.
- 13 BRASIL, **Ministério da Saúde**. Brasília, 17 de abril de 20102. Disponível em
14 [:https://www.ebcservicos.ebc.com.br/programas.html](https://www.ebcservicos.ebc.com.br/programas.html). Acesso em 18 de abril de 2012.
- 15 BREMS, R.; JEBE, E. C. Comparison of treatments with autolog; cultured stem cells
16 from adipose tissue or bone marrow. In: **International Congress Of World Equine**
17 **Veterinary Association**, v.10, p.523, 2008.
- 18 BRENNEMAN, M.; SHARMA, S.; HARTING, M.; STRONG, R.; COX, C. S.;
19 ARONOWSKI, J.; GROTTA, J. C.; SAVITZ, S. I. Autologous bone marrow
20 mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-
21 aged rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 140-149,
22 2010.
- 23 BROUGHTON B.R.; LIM R.; ARUMUGAM T.V. Post-stroke inflammation and the
24 potential efficacy of novel stem cell therapies: focus on amnion epithelial cells. **Front**
25 **Cell Neuroscience**, v.17; n.6, p. 66, 2013.
- 26 BURGESE, L. F.; FONSECA PINTO, A. C. B. Avaliação da discopatia em cães por
27 métodos de imagem. Parte 2 - Tomografia computadorizada: revisão de
28 literatura. **Clínica Veterinária**, n.80, p.40-46, 2009. Disponível em:
29 <http://www.editoraguara.com.br/cv /ano14/cv80/cv80.htm>>. Acesso em: 02 mar.
30 2015.

- 1 BURK, J.; RIBITSCH, I.; GITTEL, C.; JUELKE, H.; KASPER, C.; STASZYK, C.;
2 BREHM, W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal
3 cells derived from different sources. **The Veterinary Journal**, v. 195, p. 98-106, 2013a.
- 4 BURK, J.; BADYLAK, S. F.; KELLY, J.; BREHM, W. Equine cellular therapy – from stall
5 to bench to bedside? **Cytometry**, v.83, n.1, p.103-113, 2013b.
- 6 BURKE, Z.D.; THOWFEEQU, S.; PERAN, M.; TOSH D. Stem cells in the adult
7 pancreas and liver. **Biochem J.**, v. 404, n. 2, p.169-78, 2007.
- 8 BUTTERY, L. D. ; BOURNE, S.; XYNOS, J. D.; WOOD, H.; HUGHES, F. J.; HUGHES,
9 S. P.; EPISKOPOU, V.; POLAK, J. M. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone
10 formation from murine embryonic stem cells. **Tissue Engineering**, v.7, p. 89-99. 2001.
- 11 CAMBRIDGE, A. J. Radiographic diagnosis: arachnoid cyst in a dog. **Veterinary**
12 **Radiology & Ultrasound**, v.38, p.434–436, 1997.
- 13 CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cell: cell-based reconstructive therapy in
14 orthopaedics. **Journal of Tissue Engineering**, v.11, p.1198-211, 2005.
- 15 CAPLAN, A.I. Mesenchymal Stem Cells. In: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.;
16 MELTON, D.; PEDERSEN, R.; THOMAS, E. D.; THOMSON, J.; WEST, M. **Essentials**
17 **of Stem Cell Biology**. 1. ed. Elsevier Academic Press, p. 205-210, 2006.
- 18 CARLSON, N. G.; ROJAS, M. A.; REDD, J. W.; TANG, P.; WOOD, B.; HILL, K. E.;
19 ROSE, J. W. Cyclooxygenase-2 expression in oligodendrocytes increases sensitivity
20 to excitotoxic death. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 25, 2010.
- 21 CEULEMANS, A. G.; ZGAVC, T.; KOOIJMAN, R.; HACHIMI-IDRISSI, S.; SARRE, S.;
22 MICHOTTE, Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke:
23 modulatory effects of hypothermia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 1, p. 74,
24 2010.
- 25 CHA, J.; FALANGA, V. Stem cells in cutaneous wound healing. **Clinical of**
26 **Dermatology**, v.25, n. 1, p. 73-78, 2007.
- 27 CHEN, J.H.; OU, Y.C.; LIOA, S.L.; CHEN, W.Y. Transplantation of bone marrow
28 stromal cells for peripheral nerve repair. **Experimental neurology**, v. 204, p. 443-453,
29 2007.

- 1 CHEN, Z.; SAYED-AHMED, M. M.; KRASSIOUKOV, A.; AL-YAHYA, A.A. Potential
2 role of oxidative stress on the prescription of rehabilitation interventions in spinal
3 cord injury. **Spinal Cord**. v.51, n. 9, p.656-62, 2013.
- 4 CHEN, H. C.; HSU, P.W.; TZAAN, W.C.; LEE, A.W. Effects of the combined
5 administration of vitamins C and E on the oxidative stress status and programmed cell
6 death pathways after experimental spinal cord injury. **Spinal Cord**. V.52, n.1, p. 24-8,
7 2014.
- 8 CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **The Lancet**
9 **Neurology**, v.1, n. 2, p. 92-100, 2002.
- 10 CLEGG, P.D.; PINCHBECK, G.L. Evidence-based medicine and stem cell therapy:
11 how do we know such technologies are safe and efficacious? **Veterinary Clinics of**
12 **North America: Equine Practice**, v. 27, p. 373-382, 2011.
- 13 COELHO, B. P.; GIRALDI-GUIMARÃES, A. Effect of age and gender on recovery after
14 stroke in rats treated with bone marrow mononuclear cells. **Neuroscience research**,
15 2014.
- 16 COLOMÉ, L.M.; GOMES, C.; CROSIGNAM, M.. Utilização de células tronco autólogas
17 de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de
18 tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p.2529-2534, 2008.
- 19 CORTES, A. J.; RUIZ, M. A. .Autologous hematopoietic stem cell transplantation in
20 classical hodgkin's lymphoma. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** ,
21 v. 33, p. 10-14, 2011.
- 22 COUGHLAN, A. R. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord trauma. **Journal**
23 **of Small Animal Practice**, Oxford, v.34, p.117-122, 1993.
- 24 CRAIN, B. J.; TRAN, S. D.; MEZEY, E. Transplanted human bone marrow cells
25 generate new brain cells. **Journal of the neurological sciences**, v. 233, n. 1, p. 121-
26 123, 2005.
- 27 DAHLGREN, L. A.; MOHAMMED, H. O.; NIXON, A. J. Temporal expression of growth
28 factors and matrix molecules in healing tendon lesions. **Journal of Orthopedic**
29 **Research.**, v.23, p.84-92, 2008.

- 1 DASARI, V. R.; VEERAVALLI, K. K.; DINH, D. H. Mesenchymal stem cells in the
2 treatment of spinal cord injuries: A review. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 2, p.
3 120-33, April 26 2014. Disponível em:
4 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24772239> >. Acessado em 07 de maio 2015.
- 5 DAVID, S.; KRONER, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after
6 spinal cord injury. **Natural Revision Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 388-99, July 2011.
7 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673720> >. Acessado em 22
8 de setembro de 2014.
- 9 DIANA YU, B.S.; SILVA, G.A. Stem cell sources and therapeutic approaches for
10 central nervous system and neural retinal disorders. **Neurosurgery Focus**. n. 24, p. 3-
11 4, 2009.
- 12 DITUNNO, J. F.; LITTLE, J.W.; TESSLER, A.; BURNS, A.S. Spinal shock revisited: a
13 four-phase model. **Spinal Cord**, v. 42, n. 7, p. 383-95, Jul 2004. Disponível em:
14 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037862> >. Acessado em 23 de abril de 2013.
- 15 DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection,
16 axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. **Exp Neurology**, v.
17 209, n. 2, p. 378-88, Feb 2008.. Disponível em:
18 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662717> >. Acessado em 26 de junho de
19 2013 .
- 20 DUNHAM, K.; FLOYD, C. Contusion Models of Spinal Cord Injury in Rats. In: LANE,
21 E. L. e DUNNETT, S. B. (Ed.). **Animal Models of Movement Disorders**: Humana
22 Press (Neuromethods), v.62, cap. 18, p.345-362, 2011.
- 23 DUSART, I.; SCHWAB, M.E. Secondary cell death and inflammatory reaction after
24 dorsal hemisection of the rat spinal cord. **European Journal Neuroscience**., n.6, p.
25 712-24, 1994.
- 26 FAGOT-LARGEAULT, A., Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões
27 filosóficas e antropológicas. Estudos avançados. vol.18, no.51, p.227-245,2004
28 Disponível em www.scielo.br. Acesso em março de 2015.

- 1 FAULKNER, J., SCHALLER, M., PARK, J. H., & DUNCAN, L. A. . Evolved disease-
2 avoidance mechanisms and contemporary xenophobic attitudes. **Group Processes &**
3 **Intergroup Relations**, 7 (4), p.333 – 353, 2004
- 4 FIGLEY, S. A.; KHOSRAVI, R.; LEGASTO, J.M.; TSENG Y.F. Characterization of
5 vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic
6 spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 31, n. 6, p. 541-52, 2014.
- 7 FITCH, M. T.; SILVER, J. Glial cells, inflammation, and CNS trauma. Modulation of the
8 inflammatory environment after injury can lead to long-distance regeneration beyond
9 the glial scar. In: KORDOWER, J. H. e TUSZYNSKI, M. H. (Ed.). **Central Nervous**
10 **System Regeneration**. London: Academic Press, 2008.
- 11 FLAX, J.D.; AURORA, S.; YANG, C. . Engraftable human neuralstem cells respond to
12 developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. **National**
13 **Biotechnology**, n.16, p.1033–1039, 1998.
- 14 FLEMING, J. C.; NORENBURG, M.D.; RAMSAY, D.A.. The cellular inflammatory
15 response in human spinal cords after injury. **Brain**, v. 129, n. Pt 12, p. 3249-69, Dec
16 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071951>> acessado
17 em 08 de julho de 2014.
- 18 FORGHANI, R.; KIM, H. J.; WOJTKIEWICZ, G. R.; BURE, L.;WU, Y.; HAYASE, M.;
19 WEI, Y.; ZHENG, Y.; MOSKOWITZ, M. A.; CHEN, J. W. Myeloperoxidase propagates
20 damage and is a potential therapeutic target for subacute stroke. **Journal of Cerebral**
21 **Blood Flow & Metabolism**, 2014.
- 22 FREITAS, F. Doação de medula óssea: dúvidas e questões freqüentes, 2005.
23 Disponível em:<http://topazio1950.blogs.sapo.pt/49513.html>. Acesso em: 27/11/
24 2008.
- 25 FRIEDENSTEIN, A. J. ; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I. ; PETRAKOVA, K. V.
26 Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of embryology and**
27 **experimental morphology**, v.16, 381–390, 1966.
- 28 FRIEDENSTEIN, A.J. ; CHAILAKHJAN, R.K. ; LALYKINA, K.S. The development of
29 fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.
30 **Cell and tissue kinetics**, v. 3, p. 393–403, 1970.

- 1 FRISEN, J.; BARNABÉ-HEIDER, F. Stem cells for spinal cord repair. **Cell Stem Cell.**
2 v. 3; n. 3(1) p.16-24, 2008.
- 3 FURLAN, J. C.; SAKAKIBARA; B.M.; MILLER, W.C.. Global incidence and
4 prevalence of traumatic spinal cord injury. **Canadian Journal Neurologic Science**, v.
5 40, n. 4, p. 456-64, 2013.
- 6 GASPER, P.W.; THRALL, M.A. Hemopoietic stem cell transplantation. In: FELDMAN,
7 B.F. et al. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins,2000.
8 Cap.17. p.97-101, 2000.
- 9 GERARDO-NAVA, J.; MAYORENKO; I.I.; GREHL, T,. Differential pattern of
10 neuroprotection in lumbar, cervical and thoracic spinal cord segments in an
11 organotypic rat model of glutamate-induced excitotoxicity. **Journal Chemical**
12 **Neuroanatomy**, v. 53, p. 11-7, 2013. Disponível em:
13 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126226> >.
- 14 GERZANICH, V., WOO S.K., VENNEKENS R,. Expression of Trpm4 initiates
15 secondary hemorrhage in spinal cord injury. **National Medicine**, v. 15, n. 2, p. 185-91,
16 Feb 2009.
- 17 GIMBLE J, GUILAK F. Adipose-derived adult stem cells:isolation, characterization,and
18 differentiation potential. **Cytotherapy**, 5:362-69, 2003.
- 19 GIRALDI-GUIMARÃES, A.; REZENDE-LIMA, M.; BRUNO, F. P.; MENDEZ-OTERO,
20 R. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and
21 decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain**
22 **Research**, v. 1266, p. 108-120, 2009.
- 23 GIRALDI-GUIMARÃES, A.; DE FREITAS, H. T.; COELHO, B. D. P.; MACEDO-
24 RAMOS, H.; MENDEZ-OTERO, R.; CAVALCANTE, L. A.; BAETAS-DA-CRUZ, W.
25 Bone marrow mononuclear cells and mannose receptor expression in focal cortical
26 ischemia. **Brain Research**, v. 1452, p. 173-184, 2012.
- 27 GUILAK F, LOTT KE, AWAD HA, CAO Q, HICOK KC, FERMOR B, et al. Clonal
28 analysis of the differentiation potential of human adipose derived adult stem cells.
29 **Journal of Cell Physiology**, 206:229-37, 2006.

- 1 GRITTI, A.; PARATI, E.A.; COVA, L.; FROLICHSTHAL, P.; GALLI, R.; WANKE, E. et
2 al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in
3 response to basic fibroblast growth factor. **Journal Neuroscience**, 16:1091–1100,
4 1996.
- 5 GRITTI, A.; VESCOLI, A.L.; GALLI,R. Adult neural stem cells plasticity and
6 developmental potential. **Journal of physiology Paris**, v. 96(1-2), p.81-89, 2002.
- 7 GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D. M.; LEDDY, H. A.; ROBEY, P. G.; STORMS, R. W.;
8 GIMBLE, J. M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived
9 stromal cells. **Journal of Cell Physiology**, 189:54-63, 2001.
- 10 GUIMARÃES, M. Novas ramificações: brasileiros dominam técnica para transformar
11 células adultas em embrionárias. **Pesquisa FAPESP.**, n.156, p.45-47,2009.
- 12 GUTIERREZ-NIBEYRO, S.D. Commercial cell-based therapies for musculoskeletal
13 injuries in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 27, p.
14 363-371, 2011.
- 15 HAO, L.; ZOU, Z.; TIAN, H.; ZHANG, Y.; ZHOU, H.; LIU, L. Stem Cell-Based Therapies
16 for Ischemic Stroke. **BioMedical Research International**, v. 2014, 2014.
- 17 HAO, Q.; SU, H.; PALMER, D.; SUN, B.; GAO, P.; YANG, G.-Y.; YOUNG, W. L. Bone
18 marrow-derived cells contribute to vascular endothelial growth factor–induced
19 angiogenesis in the adult mouse brain by supplying matrix metalloproteinase-9.
20 **Stroke**, v. 42, n. 2, p. 453-458, 2011.
- 21 IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to
22 translation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 7, p. 796-808, 2011.
- 23 IGNATIADIS, I. A.; YIANNAKOPOULOS, C. K.; BARBITSIOTI, A. D. Diverse types of
24 epineural conduits for bridging short nerve defects. An experimental study in the rabbit.
25 **Microsurgery**, v.27, p. 98-104, 2007.
- 26 IIHOSHI, S.; HONMOU, O.; HOUKIN, K.; HASHI, K.; KOCSIS, J. D. A therapeutic
27 window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral
28 ischemia in adult rats. **Brain Research**, v. 1007, n. 1, p. 1-9, 2004.

- 1 JAIN, M.; ARMSTRONG, R.J.; TYERS, P. GABAergic immunoreactivity is predominant
2 in neurons derived from expanded human neural precursor cells in vitro. **Exp**
3 **Neurology**, n. 182, p. 113–123, 2003.
- 4 JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I.; BRUDER, S. P. Osteogenic
5 Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro.
6 **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, p. 295–312, 1997.
- 7 JEAN, G.F.; STELIO P.L.; BRONDANI, J.T., Comparison of decompressive surgery,
8 electroacupuncture, and decompressive surgery followed by electroacupuncture for
9 the treatment of dogs with intervertebral disk disease with long-standing severe
10 neurologic deficits. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.
11 236, n. 11, p. 1225-1229, 2010.
- 12 JIM, M.; CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B. Concise review: mesenchymal
13 stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and
14 potential for homing. **Stem cells**. Volume 25, Issue 11, Article first published online:
15 26 JUL, 2007.
- 16 JONES D. L.; WAGERS A. J. No place like home: anatomy and function of stem cell
17 niche. **National Review Molecular and Cell Biology**, n. 9, p.11-21, 2008
- 18 JONES, L. L.; SAJED, D.; TUSZYNSKI, M. H. Axonal regeneration through regions of
19 chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of
20 permissiveness and inhibition. **Journal Neuroscience**, v. 23, n. 28, p. 9276-88, 2003.
211. KARIMI-ABDOLREZAEI, S.; EFTEKHARPOUR, E.; WANG, J.; SCHUT, D.
22 Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase,
23 and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured
24 spinal cord. **Journal Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 1657-76, 2010.
- 25 KARIMI-ABDOLREZAEI, S. EFTEKHARPOUR, E.; WANG, J.; SCHUT, D.
26 Chondroitinase and growth factors enhance activation and oligodendrocyte
27 differentiation of endogenous neural precursor cells after spinal cord injury. **PLoS**
28 **One**, v. 7, n. 5, p. 375-89, 2012.

- 1 KATZ, A.J., THOLPADY, A.; THOLPADY, S.S.; SHANG, H.; OGLE, R.C. Cell surface
2 and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal
3 (hADAS) cells. **Stem Cells**. n. 23, p.412-23, 2005.
- 4 KAZAKOS, G.; POLIZOPOULOU, Z.S.; M. N. PATSIKAS, M.N.; TSIMOPOULOS, G
5 , Duration and Severity of Clinical Signs as Prognostic Indicators in 30 Dogs with
6 Thoracolumbar Disk Disease After Surgical Decompression. **Journal of Veterinary**
7 **Medicine** Series A, 52: 147–152, 2005.
- 8 KÖRBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic
9 concept? **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 6, p. 570-582, 2003.
- 10 KRAMER, A. S.; HARVEY, A.R.; PLANT, G.W. Systematic review of induced
11 pluripotent stem cell technology as a potential clinical therapy for spinal cord
12 injury. **Cell Transplant**, v. 22, n. 4, p. 571-617, 2013.
- 13 KRAUS, K.H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration.
14 **Veterinary Surgery**, n.35, p. 232–242, 2006
- 15 KRAUSE, D. S.; THEISE, N. D.; COLLECTOR, M. I.; HENEGARIU, O.; HWANG, S.;
16 GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S. J. Multi-organ, multi-lineage engraftment
17 by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v. 105, n. 3, p. 369-377, 2001.
- 18 KREBSBACH, P. H.; KUZNETSOV, S. A. ; SATOMURA, K. ; EMMONS, R. V. ; ROWE,
19 D. W. ; ROBEY, P. G. Bone formation in vivo: Comparison of osteogenesis by
20 transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. **Transplantation**, v. 63,
21 p.1059–1069, 1997.
- 22 KOCH, T. G.; BERG, L. C.; BETTS, D. H. Current and future regenerative medicine –
23 Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering
24 in equine medicine. **Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.155-165, 2009.
- 25 KWAN, D. M.; WAN, D. C.; LONGAKER, M. T. Skeletal-Tissue Engineering. In:
26 LANZA, R. ; LANGER,R. ; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**, 3 ed. ,
27 San Diego, Elsevier Academic Press, cap. 62, p. 935-944, 2007.

- 1 LECOUTEUR, R.A.; CHILD, G. Moléstias da medula espinhal. In: ETTINGER, S.J.
2 **Tratado de medicina veterinária: Moléstias do cão e do gato**. 3 ed. São Paulo:
3 Manole, cap.62, p.655-736, 1992.
- 4 LEE, R. H.; KIM, B.; CHOI, I. Characterization and expression analysis of
5 mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cell**
6 **Physiology and Biochemical**, n.14, p. 311-24, 2004.
- 7 LELEKOV-BOISSARD, T.; CHAPUISAT, G.; BOISSEL, J.-P.; GRENIER, E.;
8 DRONNE, M.-A. Exploration of beneficial and deleterious effects of inflammation in
9 stroke: dynamics of inflammation cells. **Philosophical Transactions of the Royal**
10 **Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 367, n. 1908, p.
11 4699-4716, 2009.
- 12 LESKOVAR, A.; MORIARTY, L.J.; TUREK, J.J.; SCHOENLEIN, I.A.; BORGENS R.B.
13 The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels
14 of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. **The**
15 **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. Pt 12, p. 1783-95, Jun 2000. Disponível
16 em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10821736> >.Acessado em 15 de fevereiro
17 de 2015.
- 18 LI, H.; FU, X.; OUYANG, Y.; CAI, C.; WANG, J.; SUN, T. Adult Bone-Marrow-Derived
19 Mesenchymal Stem Cells Contribute To Wound Healing Of Skin Appendages. **Cell**
20 **Tissue Research**, v. 326, n. 3, p. 725-736, 2006.
- 21 LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS
22 injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S232-S240,
23 2006.
- 24 MAJORS, A. K.; BOEHM, C. A.; NITTO, H.; MIDURA, R. J.; MUSCHLER, G. F.
25 Characterization of Human Bone Marrow Stromal Cells with Respect to Osteoblastic
26 Differentiation. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, n. 4, p. 546-557, 1997.
- 27 MARTIN, D. R.; COX, N. R.; HATHCOCK, T. L.; NIEMEYER, G. P.; BAKER, H. J.
28 Isolation and characterization of multipotentialmesenchymal stem cells from feline
29 bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 879–886, 2002.

- 1 McDONALD, J. W.; SADOWSKY, C. Spinal-cord injury. **Lancet**, v. 359, n. 9304, p.
2 417-25, Feb 2 2002. Disponível em:
3 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844532> >. Acessado em 17 de agosto 2014.
- 4 MENDEZ-OTERO, R.; ZAVERUCHA-DO-VALLE, C. Z.; MELLO, L. E. A.;
5 CARVALHO, A. C. C. Introdução as Células-Tronco. Terapias Avançadas. Rio de
6 Janeiro. **Atheneu**, p. 3-7, 2007.
- 7 MENDEZ-OTERO, R.; GIRALDI-GUIMARÃES, A.; PIMENTEL-COELHO, P. M.;
8 FREITAS, G. R. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de**
9 **Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 99-103, 2009.
- 10 MENDEZ-OTERO R., CAMPOS DE CARVALHO A. C. Global update: Brazil
11 **Regenerative Medicine**, v.7(6 Suppl), p.144-7, 2012.
- 12 MEINTJES, E.; HOSGOOD, G.; DANILOFF, J. Pharmaceutictreatmentofacute spinal
13 cord trauma. **Compendium on Continuing Education for the Practicing**
14 **Veterinarian**, Princeton, v.18, n. 6, p. 625-635, 1996.
- 15 MINGRONI-NETTO, R. C.; DESSEN, E. M. B. Células-Tronco: o que são e o que
16 serão?. Genética na Escola . Centro de Estudos do Genoma Humano. Departamento
17 de Genética e Biologia Evolutiva Instituto de Biociências USP, v. 1 n. 1, p.12-15, 2006.
- 18 MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of
19 mesenchymalprogenitorcells. **Brazilian Journal of Medical and Biological**
20 **Research**, v. 33, n. 8, p. 881-887, Aug. 2000.
- 21 MOLINA, A. I.; CRISTANTE, A. F.; FILHO T. E. Análise comparativa da avaliação
22 funcional realizada na lesão medular em animais. **Acta Ortophedic**
23 **Brasilian**. vol.12 no.1 São Paulo, 2004.
- 24 MOZID, A. M.; ARNOUS, S.; SAMMUT, E. C.; MATHUR, A. Stem cell therapy for heart
25 diseases. **British Medical Bulletin**. v. 98, p. 143-159, 2011.
- 26 MYER, D. J.; GURKOFF, G. G.; LEE, S. M.; HOVDA, D. A. Essential protective roles
27 of reactive astrocytes in traumatic brain injury. **Brain**, v. 129, n. Pt 10, p. 2761-72,
28 2006.

- 1 NISHIKAWA, S. I., GOLDSTEIN, R.A., NIERRAS, C.R. The promise of human induced
2 pluripotent stem cells for research and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell**
3 **Biology**, n.9, p.725-29, 2009.
- 4 NOREMBERG, M. D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord
5 injury: defining the problems. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, n. 4, p. 429-40, Apr
6 2004.
- 7 NSCISC, N. S. C. I. S. C. **Annual report for the spinal cord injury model**
8 **system**. <http://www.nscisc.uab.edu>. 2013. Acessado em 22 de abril de 2015.
- 9 NUNES, V. A.; ZATZ, M. Doenças genéticas: como trata-las. In: ZAGO, M.A.; COVAS,
10 D.T. Células tronco: a nova fronteira da medicina. 14. São Paulo, Atheneu, cap. 14, p.
11 197-220, 2006.
- 12 ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THONSON, J. A. Multilineage differentiation from
13 human embryonic stem cells lines. **Stem Cells**, v. 19, p.193-204, 2001.
- 14 OLBY, N.; JEFERRY, N. Pathogenesis of diseases of the central nervous system. In:
15 SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 3.
16 Cap 77, p. 1132-1147, 2003.
- 17 ORKIN, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. **Nature**
18 **Reviews Genetics**, v. 1, n. 1, p. 57-64, 2000.
- 19 OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic
20 precursors. **Ciba Foundation symposium**, v. 136, p. 42–60, 1988.
- 21 PELLEGRINO, R. B. S. Intradiscal Thermal Therapy Does Not Stimulate Biologic
22 Remodeling in an In Vivo Sheep Model, **Spine**: v. 31, n. 2, p. 139-145, 2003.
- 23 PROFYRIS, C.; CHEEMA, S. S.; ZANG, D,. Degenerative and regenerative
24 mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiology Disorder**, v. 15, n. 3, p. 415-
25 36, 2004.
- 26 QUARTO, R.; MASTROGIACOMO, M; CANCEDDA, R. Repair of large bone defects
27 with the use of autologous bone marrow stromal cells. **The New England Journal of**
28 **Medicine**. n. 344, p. 385–386, 2001.

- 1 REGAN, R. F.; GUO, Y. Toxic effect of hemoglobin on spinal cord neurons in culture.
2 **Journal Neurotrauma**, v. 15, n. 8, p. 645-53. Disponível em:
3 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9726263> >. Acessado em 09 de setembro de
4 2014.
- 5 REHEN, S.; PAULSEN, B. Células-tronco: o que são? Para que servem? Rio de
6 Janeiro: **Viera&Lent**, Coleção Ciência, v. 2, p. 96 , 2007.
- 7 RICHARDSON, L. E.; DUDHIA, J.; CLEGG, P. D.; SMITH, R. Stem cells in veterinary
8 medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends in**
9 **Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 409-416, 2007.
- 10 ROSENTHAL, N. Prometheus's Vulture and the Stem-cell Promise, **The New**
11 **England Journal of Medicine**, v. 349, p. 267-274, 2003.
- 12 RUIZ, M. A. Cell therapy in Brazil: time for reflection. **Revista Brasileira de**
13 **Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, p. 296-2998, 2013.
- 14 SAMADIKUCHAKSARAEI, A. An overview of tissue engineering approaches for
15 management of spinal cord injuries. **Journal of Neuroengineering and Rehabilitation**,
16 p.4-15, 2007
- 17 SAMPAIO, M. D. F. D. S.; MARCILIO, F. D. S.; GIRALDI-GUIMARÃES, A. Does
18 treatment with bone marrow mononuclear cells recover skilled motor function after
19 focal cortical ischemia? Analysis with a forelimb skilled motor task in rats. **Brain**
20 **Research**, v. 1492, n. 0, p. 130-139, 2013.
- 21 SAVITZ, S. I.; MISRA, V.; KASAM, M.; JUNEJA, H.; COX, C. S.; ALDERMAN, S.;
22 AISIKU, I.; KAR, S.; GEE, A.; GROTTA, J. C. Intravenous autologous bone marrow
23 mononuclear cells for ischemic stroke. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 1, p. 59-69,
24 2011.
- 25 SCHWAB, J. M.; BRECHTEL, K.; NGUYEN, T. D. Persistent accumulation of
26 cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by
27 endothelium following spinal cord injury. **Journal Neuroimmunology**, v. 111, n. 1-2,
28 p. 122-30, 2000.

- 1 SCHWEIGREITER, R.; BANDTLOW, C. E. Nogo in the injured spinal cord. **Journal**
2 **Neurotrauma**, v. 23, n. 3-4, p. 384-96, 2006.
- 3 SEILER, G. S.; ROBERTSON, I. D.; MAI, W.; WIDMER, W.R. Usefulness of a half-
4 fourier acquisition single-shot turbo spin-echo pulse sequence in identifying arachnoid
5 diverticula in dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, n.53, p.157–161, 2012.
- 6 SHIMITZU, S.; KITADA, M.; ISHIKAWA, H. Peripheral nerve regeneration by the in vitro
7 differentiated-human bone marrowstromal cells with schann cell property.
8 **Biochemical and biophysical research communications**, v. 259, p. 915-920, 2007.
- 9 SHORES, A.; BRAUND, K. G.; BRAUNER, W. R. Management of acute spinal cord
10 trauma. **Veterinary Medicine**, v.85, p.724-739, 1990.
- 11 SIDDIQUI, M. M.; WILSON K. M.; EPSTEIN, M. M. Vasectomy and risk of aggressive
12 prostate cancer: A 24-year follow-up study. **Journal Clinical Oncology**, n. 32, p.3033-
13 3038, 2014.
- 14 SIMPSON S.T. Intervertebral disc disease. **Veterinary Clinical of North American**
15 **Small Animal Practice**. v.22, n.4, p. 889-97, 1992.
- 16 SINGEC, I.; JANDIAL, R.; CRAIN, A.; NIKKHAH, G.; SNYDER, E. Y. The leading edge
17 of stem cell therapeutics. **Annual Review of Medicine**, n. 58, p.313–328, 2007.
- 18 SOUZA, C. F.; NAPOLI, P.; HAN, S. W.; LIMA, V. C.; CARVALHO, A. C. C. Células
19 troncomesenquimais: células ideias para a regeneração cardíaca? **Revista Brasileira**
20 **de Cardiologia Invasiva**. v. 18, n. 3, p. 344-353, 2010.
- 21 STEWART, M. C. Cell-based therapies: current issues and future directions.
22 **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 27, p. 393-399, 2011.
- 23 TARLOV, I.M. Spinal cord compression studies: III. Time limits for recovery after
24 gradual compression in dogs. **AMA Archive of Neurology Psychiatry**, 71:588-597,
25 1954.
- 26 TASSO, R.; AUGELLO, A.; CARIDA, M. Development of sarcomas in mice implanted
27 with mesenchymal stem cells seeded onto bioscaffolds. **Carcinogenesis**, v. 30, p.
28 150-157, 2009.

- 1 TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal
2 cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **Journal of Neurosurgery**, v.
3 75, n. 1, p. 15-26, 1991. Disponível em:
4 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2045903> >.
- 5 TAYLOR, S. E.; SMITH, R. K. W.; CLEGG, P. D. Mesenchymal stem cell therapy in
6 equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? **Equine Veterinary**
7 **Journal**. v. 39, n. 2, p. 172 – 180, 2007.
- 8 THOMAS, E. D., Bone marrow transplantation: a historical review. Department of
9 Medicine, University of Washington, and Fred Hutchinson Cancer Research Center.
10 **Seminars in Hematology** , v. 36(4 Suppl 7), p.95-103, 2000.
- 11 THURET, S.; MOON, L. D.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord
12 injury. **National Review Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 628-43, Aug 2006.
- 13 TIRALOCHE, G.; GIRARD, C.; CHOUINARD, L. Effect of oral glucosamine on
14 cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, n.
15 52, p. 1118–1128, 2005
- 16 TOOMBS, J.P.; BAUER, M.S. Basic operative techniques. In: SLATTER, D. (Ed.).
17 **Textbook of small animal surgery**.2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 168-191,
18 1993.
- 19 TRINDADE, A. B. Células-tronco e sua utilização na regeneração de nervo periférico
20 –revisão. **Revista Científica de Medicina veterinária - Pequenos Animais e**
21 **Animais de Estimação**, v. 10, n. 35, p. 1-637, 2012.
- 22 TZEKOU, A.; FEHLINGS, M. G. Treatment of spinal cord injury with intravenous
23 immunoglobulin G: preliminary evidence and future perspectives. **Journal of Clinical**
24 **Immunology**, v. 34 Suppl 1, p. S132-8, 2014.
- 25 VAN DUIJNHOFEN, N. T.; JANSSEN, T. W.; GREEN, D. J. Effect of functional
26 electrostimulation on impaired skin vasodilator responses to local heating in spinal cord
27 injury. 1. **Journal of Applied Physiology**.v.106, n. 4, p.1065-71, 2009.

- 1 VANICKY, I.; URDZÍKOVÁ, L.; SAGANOVÁ, K.; CÍZKOVÁ, D.; GÁLIK, J. A simple and
2 reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the
3 rat. **Journal Neurotrauma**, v. 18, n. 12, p. 1399-407, 2001.
- 4 VAN MIDDENDORP, J. J.; SANCHEZ, G. M.; BURRIDGE, A. L. The Edwin Smith
5 papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. **European**
6 **Spine Journal**, v. 19, n. 11, p. 1815-23, 2010. . Disponível em:
7 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697750> >.
- 8 VAWDA, R.; FEHLINGS, M. G. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord
9 injury: current & future perspectives. **Current Stem Cell Research Therapy**, v. 8, n.
10 1, p. 25-38, 2013.
- 11 VERFAILLIE, C.M.. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell**
12 **Biology**. v.12 n.11, p.502-8, 2002.
- 13
14 VOLTARELLI, J. C.; ORTEGA, E. T.; PASQUINI, R. Transplante de células tronco
15 hematopóéticas. **Atheneu**, n. 35, p.125-35: 2009.
- 16 WAGNER, D.-C.; BOJKO, M.; PETERS, M.; LORENZ, M.; VOIGT, C.; KAMINSKI, A.;
17 HASENCLEVER, D.; SCHOLZ, M.; KRANZ, A.; WEISE, G. Impact of age on the
18 efficacy of bone marrow mononuclear cell transplantation in experimental stroke.
19 **Experimental and Translational Stroke Medicine**, v. 4, p. 17, 2012.
- 20 WAKITANI, S.; TAKAOKA, K.; HATTORI, T.; MIYAZAWA, N.; IWANAGA, T.;
21 Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and
22 subsequently destroy the joint. **Rheumatology**, v.42, p.162-165, 2003.
- 23 WALMSLEY, G. L. The relationship between clinical signs and brain herniation
24 associated with rostral tentorial mass lesions in the dog. **The Veterinary Journal**, v.
25 172, n. 2, p. 258-264, 2006.
- 26 WANG, K. C.; KOPRIVICA, V.; KIM, J. A. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a
27 Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 941-4,
28 Jun 27 2002.
- 29 WANG, J.; YU, L.; JIANG, C.; CHEN, M.; OU, C.; WANG, J. Bone marrow
30 mononuclear cells exert long-term neuroprotection in a rat model of ischemic stroke by

- 1 promoting arteriogenesis and angiogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 34,
2 p. 56-66, 2013.
- 3 WANG, H. Induced pluripotent stem cells for spinal cord injury therapy: current status
4 and perspective. **Neurology Science**, v. 34, n. 1, p. 11-7, Jan 2013.
- 5 WEBB, A. A.; JEFFREY, N. D. ; OLBY, N. J. Behavioural analysis of the efficacy of
6 treatments for injuries to the spinal cord in animals, **Veterinary Record**, n. 155, p.225-
7 230, 2004.
- 8 WHEELER, S. J.; SHARP, N. J. H. Afecção de disco intervertebral na região toraco-
9 lombar. In: **Diagnóstico e tratamento cirúrgico das afecções espinais do cão e do**
10 **gato**. São Paulo: Manole. Cap.08, p.85-108, 2005.
- 11 WHO. International perspectives on spinal cord injury Geneva World Health
12 Organization 2013 Disponível em: <
13 <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/spinal-cord-injury-20131202/e>.
14 Acesso em 24 de junho de 2014.
- 15 WILLIS, W. D. Possible Mechanisms of Central Neuropathic Pain. In: YEZIERSKI, R.
16 P. e BURCHIEL, K. **Spinal Cord Injury Pain: Assessment, Mechanisms,**
17 **Management**. Seattle: IASP Press, 2002. cap. 60-, p.443, 2002.
- 18 WOLF, M. Spinal cord compression. In: BOJRAB, M.J. **Disease mechanisms in small**
19 **animal surgery**. Philadelphia Saunders, n.2, p.1152-1157, 1993.
- 20 YEO, J. D. A. Review of experimental research in spinal cord injury. **Paraplegia**, v. 14,
21 n. 1, p. 1-11, May 1976. ISSN 0031-1758. Disponível em:
22 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/819888> >.
- 23 YING, Q. L.; NICHOLS, J.; EVANS, E. P.; SMITH, A. G. Changing Potency By
24 Spontaneous Fusion. **Nature**; v. 416, p. 545-548, 2002.
- 25 YOUNG, W. Spinal cord regeneration. **Cell Transplant**, v. 23, n. 4-5, p. 573-611, 2014.
- 26 YU, W. R.; LIU, T.; FEHLINGS, T. K.; FEHLINGS, M. G. Involvement of mitochondrial
27 signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord
28 injury. **Eurean Journal Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 114-31, 2009.

- 1 XIE, X.; TANG, Z.; CHEN, J.; YANG, J.; ZENG, W.; LIU, N.; LIU, Y. Neurogenesis of
2 adipose-derived stem cells in hydrogel. **Journal Huazhong University of Science
3 and Technology**. v. 31, n. 2, p.174-177, 2011.
- 4 ZHANG, J. F.; LI, G.; MENG, C. L.; DONG, Q.; CHAN, C. Y.; He, M. L.; LEUNG, P. C.;
5 ZHANG, Y. O.; KUNG, H. F. Total flavonoids of *Herba Epimedii* improves osteogenesis
6 and inhibits osteoclastogenesis of human mesenchymal stem cells. **Phytomedicine**,
7 v.16, p. 521–529, 2009.
- 8 ZHANG, R.; LIU, Y.; YAN, K.; CHEN, L.; CHEN, X.-R.; LI, P.; CHEN, F.-F.; JIANG, X.-
9 D. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell
10 transplantation in experimental traumatic brain injury. **Journal of Neuroinflammation**,
11 v. 10, n. 1, p. 106, 2013.
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25

1

ANEXO

2

3 **Anexo 1.** Certificado emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-
4 UENF).



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 179, intitulado "TRATAMENTO DE LESÃO MEDULAR INDUZIDA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) COM CÉLULAS TRONCO ADIPOSEO DERIVADAS E MEDULARES" sob a responsabilidade do Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 18/12/2012. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 18/12/2016.

Campos dos Goytacazes, 18 de Dezembro de 2012.

OBS: O quantitativo de animais a serem utilizados neste projeto será de 50 animais.


 Clóvis de Paula Santos
 Presidente da Comissão de Biotério
 Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602
 Tel.: (22) 2739-7180 - Fax: (22) 2739-9178 - correio eletrônico: ceua@uenf.br



5