

PABLO HERTHEL DE CARVALHO

AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA E HISTOLÓGICA DE LESÃO COMPRESSIVA DA
MEDULA ESPIHNA DE RATOS WISTAR, TRATADOS COM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

PABLO HERTHEL DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA E HISTOLÓGICA DE LESÃO COMPRESSIVA DA
MEDULA ESPIHNAIS DE RATOS WISTAR, TRATADOS COM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de março de 2011.

Prof. Clóvis Andrade Neves
(Co-orientador)

Prof^a. Betânia Souza Monteiro

Prof^a. Andréa Pacheco Batista Borges

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Orientador)

A minha mãe, Fátima Herthel, meu irmão, Carlos e, a toda minha família, que são os maiores responsáveis pela minha dedicação e perseverança para a conclusão desta etapa.

A Márcia, por todo carinho, compreensão e por estar presente em todos os dias, mesmo à distância.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna.” (John Ruskin)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por todos os anos de aprendizado e amizade e, por possibilitar o desenvolvimento do trabalho.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo que permitiu a realização do meu trabalho.

Ao professor Ricardo Junqueira Del Carlo pelo exemplo profissional, pela orientação desde a graduação, paciência, ensinamentos, conselhos e disponibilidade de me guiar em áreas tão fascinantes e desafiadoras como a Neurologia e a Terapia Celular. Sua experiência e competência auxiliaram no meu aperfeiçoamento como profissional.

À professora Betânia de Souza Monteiro do Centro Universitário de Vila Velha que me auxiliou em todas as etapas do projeto, me ensinando e me incentivando sempre. Sua amizade, competência, dedicação e apoio nunca deixaram de existir e, sem dúvidas, continuam a me lapidar, para, um dia, ser uma pessoa e profissional tão bom quanto ela.

À professora Eliane Gonçalves de Melo da Universidade Federal de Minas Gerais, que me recebeu com toda atenção e carinho, me auxiliando e ensinando, até mesmo à distância.

Às professoras Andréa Pacheco Borges e Maria Cristina Hage, que auxiliaram na moldagem do projeto e, incrementaram minha formação.

Aos professores Clóvis Andrade Neves, Sérgio Luis Pinto da Matta, Andréia Ribeiro e José Domingos Guimarães por contribuírem com minha formação e com etapas do projeto.

À professora Marlene Isabel Vargas Vitoria por todo incentivo, conselhos e por me iniciar na pesquisa através da Iniciação Científica.

Ao professor Joaquin Hérnan Patarroyo Salcedo por dispor de toda atenção e viabilizar as etapas de cultivo celular.

Ao professor Antônio José Natali, pela atenção, confiança e, por apoiar as etapas de manutenção dos animais.

Ao professor Alfredo Miranda Goes da Universidade Federal de Minas Gerais, que abriu as portas do seu grupo de pesquisa para que eu pudesse aprender mais sobre células-tronco.

A toda a equipe do Laboratório de Imunogenética do ICB, em especial a Juliana Lott Carvalho e Natália Breyner, que me ensinaram muito e continuam ensinando. A dedicação e o entusiasmo de vocês se tornaram inspiração profissional para mim.

À Bárbara Silva Okano, Marta Rocha de Araújo, Liana Mesquita Vilela, Camila Corsini e Laila de Paula Bonfá que acompanharam todo o meu projeto e sem as quais não concluiria o experimento. Sua presença, disposição e amizade foram fundamentais.

A todos os professores do Departamento de Veterinária pelos ensinamentos e exemplos, em especial aos professores Lissandro Gonçalves Conceição, Brunna Fonseca, Lukiya Favarato e Evandro Favarato, com os quais pude contar em todos os momentos desta etapa. Sua seriedade e integridade profissional foram essenciais para minha formação.

À Tatiana Duarte Schmitz e Kelly Cristina Pontes, amigas e profissionais que admiro muito.

À Deus, que me permitiu conhecer todas estas pessoas e compartilhar momentos de aprendizado, felicidade e superação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
ARTIGO I	1
Resumo	2
Abstract	3
Introdução	3
Material e Métodos	6
Resultados	9
Discussão	13
Conclusão	16
Agradecimentos	16
Referências Bibliográficas	16
ARTIGO II	24
Resumo	25
Abstract	26
Introdução	27
Material e Métodos	29
Resultados	34
Discussão	41
Conclusão	46
Agradecimentos	46
Referências Bibliográficas	47
ARTIGO III	54
Resumo	55
Abstract	56
Introdução	57
Material e Métodos	58
Resultados	63

Discussão	70
Conclusão	73
Agradecimentos	73
Referências Bibliográficas	73

LISTA DE FIGURAS

Artigo I – Células-tronco mesenquimais para transplantes em cirurgias experimentais: coleta, isolamento, expansão, caracterização e nanomarcção

Figura 1 - Fotomicrografias da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido. 9

Figura 2 - Fotomicrografias da cultura celular obtidas em microscópio eletrônico de varredura. 10

Figura 3 - Fotomicrografias das células submetidas à diferenciação osteogênica 11

Figura 4 - Avaliação da frequência de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células-tronco mesenquimais oriundas da medula óssea de ratos Wistar. 11

Figura 5 - Fotomicrografias da cultura celular obtidas por microscopia de fluorescência..... 12

Figura 6 - Fotomicrografia em 3D obtida por microscopia de força atômica. 12

Artigo II - Estudo comparativo entre o tratamento de lesão medular compressiva com células-tronco mesenquimais e succinato sódico de metilprednisolona, em ratos Wistar

Figura 1 - Fotomicrografias das CTM indiferenciadas e diferenciadas *in vitro*. 34

Figura 2 - Caracterização imunofenotípica das CTM através de citometria de fluxo. 35

Figura 3 - Fotomicrografia das CTM após nanomarcção com Q-tracker®. 35

Figura 4 - Recuperação da função motora segundo a escala de BBB.	38
Figura 5 - Fotomicrografias das secções transversais da medula espinal evidenciando a extensão da lesão.	39
Figura 6 - Distribuição do percentual de tecido preservado entre os grupos avaliados.	40
Figura 7 - Fotomicrografias da área de lesão evidenciando a presença de células com fluorescência vermelha.	41
 Artigo III - Avaliação do tempo para início do tratamento de lesão medular compressiva com células-tronco mesenquimais.	
Figura 1 - Morfologia das CTM indiferenciadas e diferenciadas <i>in vitro</i>	64
Figura 2 - Caracterização das CTM por citometria de fluxo.	64
Figura 3 - Fotomicrografia das CTM após nanomarcacão com Q-tracker®.	65
Figura 4 – Avaliação da função locomotora após lesão medular, segundo a escala de BBB.	66
Figura 5 - Fotomicrografia do tecido medular avaliado por microscopia de fluorescência.	68
Figura 6 – Área de tecido lesado nos diferentes fragmentos da medula espinal.	69

LISTA DE TABELAS

Artigo II - Tratamento de lesão medular compressiva, em ratos wistar, com células-tronco mesenquimais em comparação com succinato sódico de metilprednisolona

Tabela 1. Distribuição dos valores do teste de BBB dos 30 animais divididos em cada grupo no dia antes da lesão medular (pré-cirúrgico), 1º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dia pós-lesão medular (dplm). 36

Tabela 2. Distribuição da média e desvio padrão da avaliação funcional de BBB no dos, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dia pós-lesão medular (dplm) em cada grupo. 37

Tabela 3. Distribuição das médias e desvio padrão da área de lesão (mm²) de cada fragmento analisado por grupo de tratamento. 40

Tabela 4. Distribuição das médias e desvio padrão do percentual de área preservada de cada fragmentos analisado por grupo de tratamento. 40

Artigo III - Avaliação do tempo para início do tratamento de lesão medular compressiva com células-tronco mesenquimais

Tabela 1. Distribuição da média e desvio padrão da avaliação funcional de BBB no dos, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dia pós-lesão medular (dplm) em cada grupo. 66

Tabela 2. Valores percentuais de área preservada nos fragmentos craniais, lesão e caudais nos diferentes grupos avaliados. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASIA - *American Spinal Injury Association*
BBB - escala de Basso-Beattie-Bresnehan
BDNF - *brain-derived neurotrophic factor*
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT - células-tronco
CTM - células-tronco mesenquimais
CTS - células-tronco somáticas
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
dplm - dias pós-lesão medular
FCMMO - fração celular mononuclear da medula óssea
G3D – grupo CTM 3 dias após lesão
GCT – grupo CTM 3 horas após lesão
G7D – grupo CTM 7 dias após lesão
GC – grupo controle
GFAP - *glial fibrillary acidic protein*
GFP - *green fluorescent protein*
GM - grupo metilprednisolona 3 horas após lesão
HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
ISCT – *International Society of Cellular Therapy*
MBP - *myelin basic protein*
MEV - microscopia eletrônica de varredura
MFA - microscopia de força atômica
MO - medula óssea
MP - *methylprednisolone*
MSC - *Mesenchymal stem cells*
NASCIS - *National Acute Spinal Cord Injury Study*
NGF - *nerve growth factor*
PBS - salina tamponada com fosfato
SCI - *spinal cord injury*

SFB - soro fetal bovino

SN - sistema nervoso

SNC - sistema nervoso central

SNP - sistema nervoso periférico

SSMP - succinato sódico de metilprednisolona

VEGF - *vascular endothelial cell growth factor*

RESUMO

CARVALHO, Pablo Herthel de. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, março de 2011. **Avaliação neurológica e histológica de lesão compressiva da medula espinhal de ratos wistar, tratados com células-tronco mesenquimais.** Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-orientadores: Joaquin H. P. Salcedo e Clóvis Andrade Neves.

O tratamento efetivo para pacientes com lesão medular é motivo de diversas pesquisas. Após a obtenção de resultados satisfatórios em vários modelos experimentais, a terapia celular é considerada uma opção promissora para lesões do sistema nervoso central, sobretudo com a utilização de células-tronco. O presente trabalho avaliou o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) indiferenciadas em diferentes intervalos de aplicação endovenosa após lesão medular compressiva e realizou estudo comparativo com succinato sódico de metilprednisolona (SSMP) e nenhum tratamento. As CTM foram obtidas da medula óssea de ratos Wistar, cultivadas, caracterizadas e transplantadas na sexta passagem para animais com lesão medular. A lesão medular foi realizada com a introdução do cateter de Fogarty n.º 2 Fr. no espaço epidural T8 e insuflação do *cuff* com 50µL de salina por cinco minutos, após laminectomia das vértebras T9 e T10. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com 10 animais em cada e, submetidos a tratamentos distintos: grupo controle (GC), que recebeu aplicação de PBS; grupo metilprednisolona (GM), que recebeu 30mg/Kg de SSMP três horas após a lesão; grupo 3 horas (GCT), que recebeu administração das CTM três horas após a indução da lesão; grupo 3 dias (G3D), que recebeu as CTM após três dias da lesão; grupo 7 dias (G7D), que recebeu as CTM após sete dias da lesão medular. Foi realizada avaliação motora com a escala de Basso-Beattie-Bresnehan (BBB), semanalmente, até o 35º dia após a lesão. Em seguida, foi realizada avaliação histológica da área de lesão e percentual de área preservada nos fragmentos craniais e caudais à área de lesão macroscópica e no fragmento contendo a lesão macroscópica. Os três grupos tratados com as CTM apresentaram melhores índices de recuperação da função motora na escala de BBB, estatisticamente diferentes dos grupos GC e GM. Não foi observada diferença estatística entre os grupos GC e GM quanto à recuperação motora, através dos índices da escala de BBB. Na avaliação

histológica, os grupos tratados com as CTM exibiram menor área de lesão e maior percentual de tecido nervoso preservado que os outros grupos. Não foi observada diferenças entre os grupos GM e GC na análise histológica. Constatou-se que a terapia celular com CTM derivadas da medula óssea de ratos Wistar contribui positivamente na melhora clínica e na preservação do tecido nervoso após lesão medular compressiva.

ABSTRACT

CARVALHO, Pablo Herthel. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2011. **Mesenchymal stem cells therapy for spinal cord injury in Wistar rats: neurological recovery and histological changes.** Advisor: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-Advisors: Joaquin H. P. Salcedo and Clóvis Andrade Neves.

Effective treatment for spinal cord injury remains subject of several studies. Cell therapy is considered an option promising for lesions of the central nervous system, particularly stem cells after experimental animal models showed the transplantation of bone marrow-derived cells results in amelioration of the functional deficit in various neurological diseases. This work evaluated the effect of an intravenous injection of mesenchymal stem cells (MSCs) in different intervals after compressive spinal cord injury compared to treatment with methylprednisolone (MP) and no treatment. MSCs from rat bone marrow were cultivated and expanded *in vitro* until transplantation. Spinal cord injury was performed with 2-Fr Fogarty catheter after T9-T10 laminectomy. Animals were randomly divided into five experimental groups with 10 animals each and subjected to different treatments: group (CG), which received only PBS; MP group (GM), who received 30 mg/kg SSMP three hours after injury, group 3 hours (GCT), which received administration of MSCs three hours after induction of injury, group 3 days (G3D), received the MSC after three days of injury; and group 7 days (G7D), received MSC seven days after spinal cord injury. Animals were evaluated weekly using the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) open field locomotor test. 35 days after the lesion was performed histological evaluation. All groups treated with MSC showed better results in the motor recovery. The BBB test revealed no difference between GC and GM. In morphometric analysis, the groups treated with MSC showed minor injury area and a higher percentage of healthy tissue than other groups. No differences were observed between groups in the GM and GC analysis histology. It was found that cell therapy with MSCs contributes positively in clinical recovery and preservation of nervous tissue after compressive spinal cord injury.

ARTIGO I

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA TRANSPLANTES EM CIRURGIAS EXPERIMENTAIS: COLETA, ISOLAMENTO, EXPANSÃO, CARACTERIZAÇÃO E NANOMARCAÇÃO.

Mesenchymal stem cell for transplants in experimental surgeries: collection, isolation, expansion, characterization and labeling cells.

Células-tronco mesenquimais para transplantes em cirurgias experimentais: coleta, isolamento, expansão, caracterização e nanomarcção

RESUMO

Células-tronco mesenquimais (CTM) podem ser isoladas de vários tecidos adultos, sobretudo da medula óssea (MO). Foi realizada a coleta, isolamento, expansão, caracterização e nanomarcção de CTM da MO de ratos Wistar com o objetivo de obter células para posterior aplicação em modelos animais. A morfologia celular foi avaliada durante todo o tempo de cultivo, e a cada passagem foi realizada a contagem e viabilidade celular. Alíquotas das células da quarta passagem foram submetidas aos testes de diferenciação osteogênica *in vitro* e imunofenotipagem com os anticorpos anti-CD45, anti-CD90, anti-CD73 e anti-CD54. Adicionalmente, procedeu-se nanomarcção com nanocristais fluorescentes. As células em culturas apresentaram morfologia fibroblastóide, com aderência à placa de cultivo e viabilidade superior a 92,70%. As células apresentaram 83,09% de expressão negativa para CD45, 93,83% de expressão positiva para CD54, 70,44% para CD73 e 98,82% para CD90. A avaliação das culturas diferenciadas demonstrou morfologia de osteoblasto e presença de matriz calcificada. Foi observada alta fluorescência citoplasmática das células nanomarcadas, que permaneceu após as etapas de tripsinização e por todo o período de avaliação *in vitro*. Os resultados demonstram que os procedimentos de coleta e cultivo de CTM de ratos Wistar utilizados viabilizam os trabalhos laboratoriais para posterior aplicação destas células em estudos *in vivo*. Ademais, a nanomarcção celular foi efetiva e permite acompanhamento nos processos de migração celular e reparação de lesões de diferentes naturezas em estudos experimentais pré-clínicos futuros.

Palavras-chave: Cultura celular, células-tronco, reparação tecidual

Mesenchymal stem cell for transplants in experimental surgeries: collection, isolation, expansion, characterization and labeling cells.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) can be isolated from adult tissues, especially the bone marrow (BM). To obtain MSC for use in animals models were isolation, expansion, and characterization of MSC of Wistar bone marrow. Viability and cell morphology were assessed throughout the culture period. Cells in fourth passage were subjected to differentiation osteogenic *in vitro* and immunophenotyping with anti-CD45, anti-CD90, anti-CD73 and anti-CD54 antibodies. Additionally, cells marked with fluorescent nanocrystals Qtracker Cell Labeling. The cells presented fibroblastoid, with adherence to a culture plate and viability exceeding 92.70%. Cells showed 83.09% of negative expression for CD45, 93.83% of positive expression of CD54, 70.44% for CD73 and 98.82% for CD90. The evaluation of the cultures submitted a differentiation showed osteoblastic morphology and calcified matrix. High fluorescence in cytoplasmic of labeling cells was observed, which remained after of trypsinization and during all in vitro evaluation period. Results show that procedures for collection, cultivation and use of MSC labeling with Qtracker enable the laboratory work for later application of these cells *in vivo* studies.

Keywords: Cell culture, stem cells, tissue repair

INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são células primitivas e indiferenciadas capazes de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens de células e tecidos (Caplan, 1991), descritas pela primeira vez em 1966 por Alexander Friedenstein e colaboradores (Friedenstein 1970, Owen 1988, Shenfield et al. 2002). Elas foram identificadas em cultura de células mononucleares da medula óssea e denominadas de células formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F, *colony forming units - fibroblastic*) (Friedenstein et al. 1970). Com o advento de novos conhecimentos

sobre suas propriedades biológicas, a possibilidade de tratamento utilizando-as conquistou notoriedade devido ao seu potencial terapêutico e tornou-se a principal pesquisa da medicina reparativa e engenharia de tecidos (Del Carlo et al. 2008).

As células-tronco somáticas (CTS) são as mais utilizadas em ensaios pré-clínicos e clínicos realizados em pacientes animais e humanos. Dentre elas, existe um grupo denominado de células-tronco mesenquimais (CTM) que se caracterizam como multipotentes e com ampla plasticidade, capazes de promover a manutenção e regeneração de múltiplas linhagens de células do organismo (Deans e Moseley 2000, Sotiropoulou et al. 2006, Nauta e Fibbe 2007).

As CTM estão presentes em pequenas quantidades nas regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo a medula óssea (MO), tecido adiposo, periósteo, tecido muscular, parede dos vasos que compõem o cordão umbilical e os órgãos parenquimatosos (Meirelles et al. 2008, Mambelli et al. 2009, Zucconi et al. 2010). A MO constitui um dos principais sítios doadores das CTM, sendo também fonte de células-tronco hematopoéticas e endoteliais (Pittenger et al. 1999, Minguell et al. 2000).

Em condições de cultura, as CTM exibem facilidade de crescimento em monocamadas, manutenção de multipotencialidade por várias passagens, morfologia fibroblastóide, adesão em substrato plástico e capacidade de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos sob estímulo específico (Nardi e Meirelles 2006).

As características mínimas apresentadas pelas CTM devem ser comprovadas *in vitro*, para que as mesmas possam ser utilizadas em estudos, segundo as recomendações da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT). Segundo a ISCT, para se reconhecer as CTM em cultura, estas devem apresentar morfologia fibroblastóide, capacidade de diferenciação e expressar um conjunto de marcadores de superfície celular (Domicini et al. 2006). Dependendo do tecido de origem elas podem exibir marcadores de superfície distintos (Kolf et al. 2007, Phinney e Prockop 2007). As CTM oriundas da medula óssea, por exemplo, exibem marcação positiva para CD13, CD29, CD54, CD73, CD90, CD106 e Stro-1 e não expressam de CD44 e CD45 (Domicini et al. 2006, Ocarino et al. 2008, Kode et al. 2009, Tapp et al. 2009); já as células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC) exibem marcação positiva para CD13, CD29, CD34, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD144,

CD166 e negativa para CD 106 e Stro-1 (Tapp et al. 2009, Seong et al. 2010). Estes marcadores de superfície permitem a separação dessas células por citometria de fluxo e a caracterização das CTM.

Estudos contemporâneos descrevem a utilização alógena (Barros et al. 2001, Halkos et al. 2008), autógena (Yamada et al. 2004, Del Carlo et al. 2007) e xenógena (Nakamura et al. 2007, Plotnikov et al. 2007) das CTM para a reparação de diversos tecidos e/ou afecções e engenharia de tecidos, visando o tratamento de doenças cardíacas (Shake et al. 2002, Gojo et al. 2003, Mota et al. 2005, Loffredo et al. 2011), renais (Morigi et al. 2004, Semedo et al. 2009, Asanuma et al. 2010), hepáticas (Wang et al. 2003, Lee et al. 2004, Kuo et al. 2008), oftálmicas (Haynes et al. 2004, Torquetti et al. 2007, Castanheira et al. 2008), neurológicas (Kopen et al. 1999, Cao et al. 2002, Pavlichenko et al. 2008, Moloney et al. 2010, Gutiérrez-Fernández et al. 2011) e ortopédicas (Pelttari et al. 2008, Monteiro et al. 2008, Seong et al. 2010). Estudos utilizando células-tronco em aplicações terapêuticas iniciaram-se no final dos anos 90 com o transplante da fração celular mononuclear da medula óssea (FCMMO). Essa modalidade terapêutica ainda é muito utilizada na rotina veterinária e, mesmo com percentual pequeno de CTM, os resultados são significativos (Del Carlo et al. 2007).

As CTM podem ser aplicadas no local da lesão (intra-lesional) isoladas (Hashemi et al. 2008, Hunt et al. 2008) ou combinadas com biomateriais (Toquet et al. 1999, Teng et al. 2002, Sun et al. 2007, Del Carlo et al. 2007), ou por infusão intravenosa (Halkos et al. 2008, Perasso et al. 2010), pois são atraídas por quimiotaxia para os locais de lesão (Bobis et al. 2006, Meirelles et al. 2008, Wan et al. 2008, Caplan 2009, Yu et al. 2010). Nesta última modalidade, deve-se considerar a retenção de células na microcirculação, sendo necessário o transplante de maior quantidade de células para atingir o órgão alvo (Halkos et al. 2008). Adicionalmente, as CTM expandidas em cultura, poderão ser transplantadas nas formas indiferenciada ou diferenciada (Del Carlo et al. 2007, Monteiro 2009, Haleem et al. 2010).

No presente trabalho está descrito um protocolo viável para obtenção de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos, bem como o estabelecimento da cultura, sua expansão, as etapas de caracterização fenotípica e

diferenciação celular e, a nanomarcagem das células, objetivando a produção de CTM para utilização experimental em transplantes pré-clínicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da medula óssea e cultura

Cinco ratos Wistar de quatro semanas de idade, machos, foram submetidos a eutanásia por sobredosagem anestésica. Posteriormente, foi realizada a tricotomia dos membros pélvicos e abdômen e a imersão dos animais em álcool 70°, para garantir antissepsia no momento da coleta. Os animais foram levados para a capela de fluxo vertical, posicionados em decúbito dorsal, para início dos procedimentos.

Os fêmures foram desarticulados e removidos de forma asséptica, as epífises distais foram seccionadas e o canal medular foi lavado com meio de crescimento Dulbecco's Modified Eagle's Medium baixa glicose (Gibco, Grand Island/NY, EUA), contendo 10 - 15mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/EUA) acrescido de 20% de soro fetal bovino (Gibco), 50mg/L de gentamicina (Sigma), 100.000U/L de penicilina G potássica (Sigma) e 1,5mg/L de anfotericina B (Sigma); com auxílio de uma seringa de 10mL e agulha de 25G.

O material coletado foi centrifugado a 22°C por 5 minutos em 1500rpm, o sobrenadante descartado e o *pellet* contendo as células foi ressuspendido em 5 mL de meio DMEM. Foram coletados 100µL da suspensão de células, misturados com o mesmo volume de solução Azul de Tripán (Sigma) para contagem em câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade celular.

O plaqueamento foi feito na concentração mínima de 5×10^6 células/mL em garrafas de cultivo celular de 25mm² (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemanha), mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂.

As culturas foram monitoradas diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido de contraste de fase e o meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias, de acordo com a necessidade. Quando foi obtido 80% de confluência, as garrafas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e desprendidas com 1,0mL da solução tripsina/EDTA 1:250 (Gibco). Após incubação por cinco minutos em estufa, a tripsina foi inativada com meio DMEM completo. A suspensão contendo células foi centrifugada à temperatura de 22°C a 1500 rpm por

10 minutos em tubos Falcon de 15mL (TPP, Trasadingen, Suíça). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 5,0mL de meio completo. Foram realizadas contagem, viabilidade celular e novo plaqueamento para expansão celular. As culturas foram mantidas até a sexta passagem.

Avaliação da morfologia celular

A morfologia celular nos frascos de cultura foi observada diariamente em microscópio invertido e registradas em fotomicrografia digital. Adicionalmente, alíquotas de células obtidas de culturas com 24 horas, 48 horas e 15 dias após a coleta foram plaqueadas 1×10^5 células/poço em 2 placas de cultura de 6 poços (Sarstedt) contendo lamínulas para microscopia (Sarstedt). As lamínulas foram distribuídas aleatoriamente para avaliação da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA).

O meio de cultura foi retirado 48 horas após o plaqueamento, os poços foram lavados três vezes com solução PBS e posteriormente as células foram fixadas com solução de glutaraldeído 5% em tampão fosfato 0,1M (1:1) durante uma hora em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas em tampão fosfato cinco vezes de 10 minutos cada e desidratadas em bateria de álcool (30%, 50%, 70%, 80%, 90%) até álcool absoluto, em intervalos de 10 minutos. As amostras destinadas à MFA foram então avaliadas após a desidratação. As lamínulas restantes passaram pela secagem no aparelho Secador de Ponto Crítico (CPD 030, Bal-Tec), foram metalizadas com ouro (Metalizador Balzers, FDU010) e observadas para registro fotográfico no microscópio eletrônico de varredura (LEO, VP1430).

Diferenciação osteogênica

Células da quarta passagem foram desprendidas com tripsina, contadas e plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/poço, em placa de 6 poços. Foi adicionado 3mL de meio de cultura DMEN enriquecido com 10% de SFB, 10^{-8} mol/mL de dexametasona (Sigma), 5,0µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), 10,0mmol/L de β-glicerofosfato (Sigma) e a placa foi incubada a 37°C por quatro semanas. O meio foi trocado a cada 3 ou 4 dias, de acordo com a necessidade.

No 7º, 14º, 21º e 30º dia após indução da diferenciação, os poços foram lavados três vezes com PBS e corados durante cinco minutos com vermelho de

Alizarina (Sigma) à temperatura ambiente, lavados com água destilada e observados em microscópio invertido quanto à deposição de cálcio na matriz extracelular.

Imunofenotipagem das CTM

As células da quarta passagem foram desprendidas com tripsina, centrifugadas e ressuspensas em PBS para incubação em placas de 96 poços (TPP), na concentração de 1×10^6 células/poço. As amostras foram incubadas individualmente com os anticorpos primários anti-CD45 (clone 69 mouse), anti-CD90 (clone Ox-7 mouse), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse) e anti-CD54 (clone 1A29 mouse) [BD Bioscience, San Jose/CA, USA] por 30 minutos à 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad/CA, USA) sob as mesmas condições anteriores. Como controle negativo de fluorescência, também foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulosidade para estabelecer a população a ser analisada. A leitura foi feita usando citômetro de fluxo FACScan (Becton-Dickinson Immunocytometry System, San Jose/CA, EUA). Foram adquiridos 30.000 eventos, utilizando o software CELLQuest®. Os resultados foram plotados em forma de histograma e analisados no programa FlowJo (FlowJo 7.6.3®).

Nanomarcação das CTM

Células de quarta passagem, que não foram submetidas às etapas de diferenciação e imunofenotipagem, foram incubadas com o *Cell Labeling Kit Qtracker 655*® (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante.

Alíquotas das células marcadas foram obtidas 2 horas, 24 horas e 7 dias após a nanomarkação para avaliação à fresco em microscopia de fluorescência. Paralelamente, foram obtidos os *pellets* celulares e incluídos em resina (HistoResin® Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) para avaliação em microscopia de fluorescência. Nas amostras processadas histologicamente as lâminas foram contracoradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole - Invitrogen) para a identificação do núcleo.

RESULTADOS

A técnica de coleta da medula óssea, após remoção dos fêmures e lavagem do canal medular, demonstrou ser um método rápido e de fácil execução. A quantidade de células mononucleares obtidas foi sempre superior àquela mínima preconizada para se iniciar o cultivo e a viabilidade celular inicial foi em média de 92,70%.

No primeiro dia de observação foram visualizadas inúmeras células com formato arredondado, em suspensão no meio de cultura, não permitindo identificar o tipo celular. Notou-se apenas que eram células mononucleares (figura 1A). As culturas começaram a apresentar células aderentes, com morfologia fibroblastóides, 24 horas após o plaqueamento no meio DMEM completo (figura 1B).

As trocas do meio de cultura permitiram a remoção das células não aderentes da cultura. Após 5 dias de cultura foi observado confluência de 80% (figura 1C e 1D), sendo então realizada a primeira passagem. Foram necessários intervalos de 3 a 5 dias para os demais plaqueamentos até a obtenção da quarta passagem.

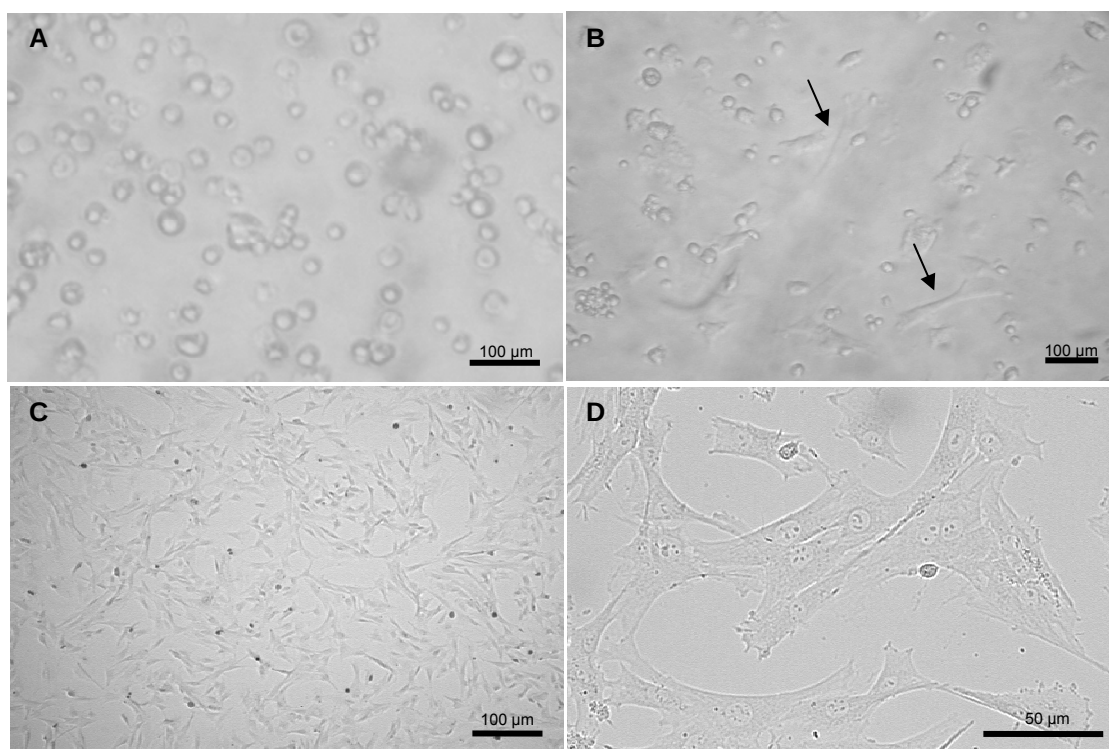


Figura 1 – Fotomicrografias da cultura celular obtidas em microscópio óptico invertido. A) Células observadas após a coleta da medula óssea de ratos exibindo morfologia arredondada. B) Presença de células aderentes, com morfologia fibroblastóide (seta), 24 horas após o início da cultura. C) Grande número de células com morfologia fibroblastóide observadas 72 horas após o início da cultura. D) Maior aumento da figura 1C demonstrando, claramente, a morfologia fibroblastóide.

A microscopia eletrônica de varredura confirmou a morfologia fibroblastóide das células em todas as placas/lâminas de cultivo desde as fases iniciais da cultura (figura 2A e 2B). As células não aderentes não foram observadas na MEV, pois foram removidas durante as lavagens realizadas no processamento do material. Foram observadas colônias provenientes de UFC nas amostras de culturas com 48 horas (figura 2C). Na avaliação de células com 15 a 20 dias em cultura (células da quarta passagem), observou-se a disposição das células em monocamada e a manutenção da morfologia alongada semelhante a fibroblastos (figura 2D).

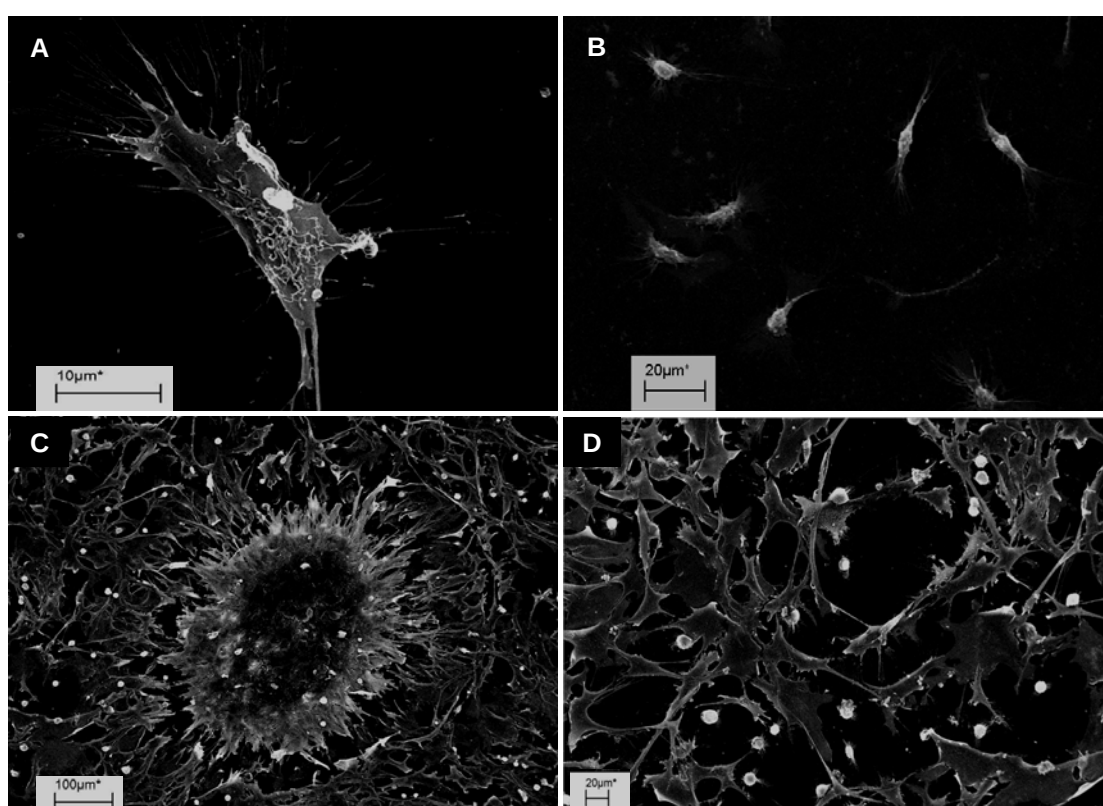


Figura 2 - Fotomicrografias da cultura celular obtidas em microscópio eletrônico de varredura. A) Célula exibindo grande número de prolongamentos para adesão ao substrato, com morfologia alongada, 24 horas após o cultivo primário. B) Pequeno número de células exibindo morfologia fibroblastóide 24 horas após o cultivo primário. C) Presença de unidade formadora de colônia (UFC) e aumento da celularidade 48 horas após o cultivo primário. D) Células em monocamada e com morfologia fibroblastóide observadas na quarta passagem.

Em todas as culturas, independente do animal doador da medula óssea, a viabilidade celular foi maior que 95,50% nas avaliações realizadas a cada passagem.

As culturas submetidas à diferenciação osteogênica apresentaram pontos de calcificação da matriz a partir dos sete dias. Nódulos mineralizados e células com morfologia arredondada, semelhante a osteoblastos foram observados a partir do 14º dia (figura 3A e 3B).

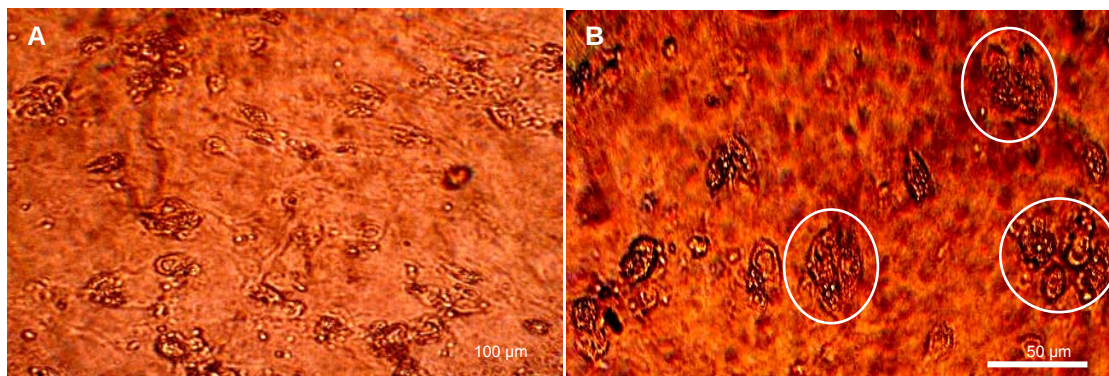


Figura 3 - Fotomicrografias das células submetidas à diferenciação osteogênica. A) Culturas submetidas à diferenciação osteogênica apresentando calcificação da matriz e nódulos de mineralização, corados pelo vermelho de Alizarina. B) Agrupamentos de células com morfologia arredondada (círculos), semelhante à osteoblastos.

As amostras da cultura na quarta passagem revelaram expressão negativa para CD45 (83,09%) e positiva para CD54 (93,83%), CD73 (70,44%) e CD90 (98,82%), caracterizando as células cultivadas como CTM (figura 4).

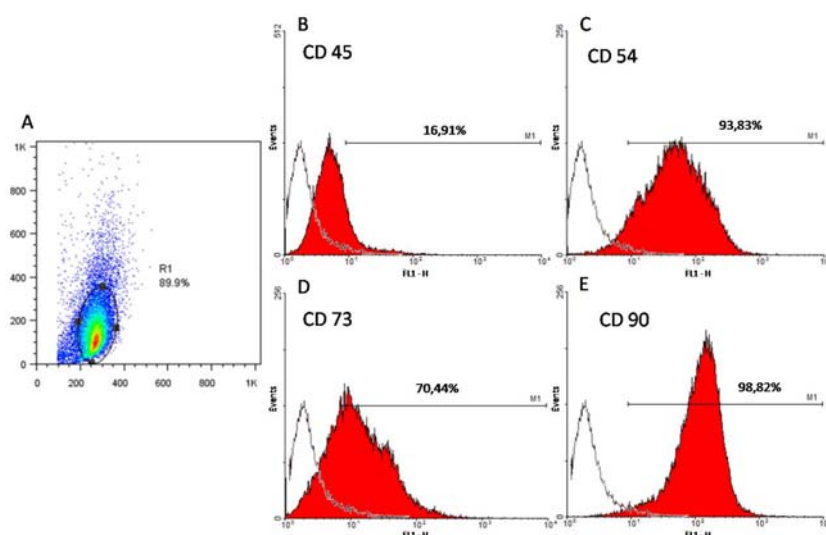


Figura 4 - Avaliação da frequência de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células-tronco mesenquimais oriundas da medula óssea de ratos Wistar. A) Gráfico de pontos demonstrando a população celular selecionada para estudo (R1). Histograma da fluorescência das células marcadas com anticorpo anti-CD45 (B), anti-CD54 (C), anti-CD73 (D) e anti-CD90 (E), mostrando o número de células marcadas em valores percentuais. O eixo X representa a escala de fluorescência, sendo considerado positivo quando as células ultrapassam 10^1 . O eixo Y indica o número de células

avaliadas (eventos). O gráfico aberto representa o controle negativo e o gráfico vermelho refere-se às células-tronco marcadas com os anticorpos.

Foi observada alta fluorescência citoplasmática (cor vermelha) nas células nanomarcadas com Qtracker 655[®], em todos os momentos de avaliação, tanto nas amostras a fresco, obtidas após a tripsinização, quanto no *pellet* processado histologicamente (figura 5).

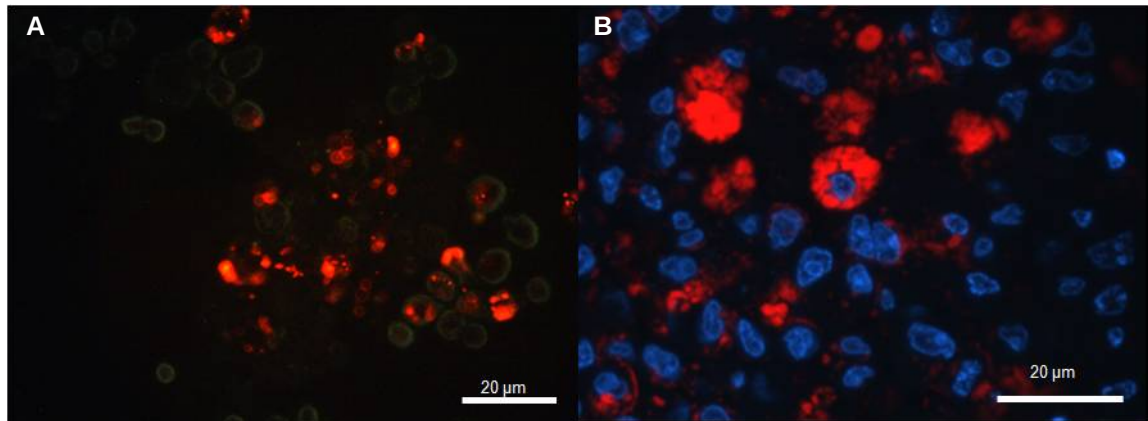


Figura 5 - Fotomicrografias da cultura celular obtidas por microscopia de fluorescência. A) Amostra da suspensão de células após desprendimento com a tripsina. As células apresentam morfologia arredondada com a presença de cristais fluorescentes no comprimento de onda 655 (vermelho). B) *Pellet* celular processado histologicamente evidenciando os cristais fluorescentes no citoplasma das células. Os núcleos apresentam colocaração azul devido à marcação com DAPI.

A utilização do microscópio de força atômica (MFA) permitiu caracterizar a superfície irregular da célula, com o delineamento da região nuclear e dos prolongamentos citoplasmáticos que auxilia na adesão da célula ao substrato (figura 6).

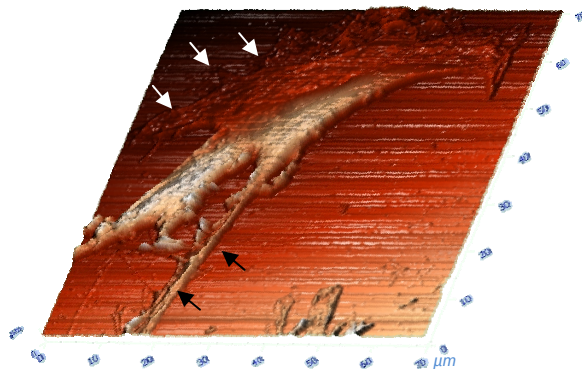


Figura 6 - Fotomicrografia em 3D obtida por microscopia de força atômica. Superfície irregular da célula, evidenciada pela variação da escala de cor. As regiões mais elevadas estão representadas na coloração branca e as mais próximas da superfície de cultura estão na coloração preta. As células

apresentam vários prolongamentos citoplasmáticos, sendo aqueles que se fixam na placa de cultivo os que apresentam menor elevação (seta branca) e aqueles que interagem com outras células são mais elevados (seta preta).

DISCUSSÃO

As CTM são isoladas de diversos tecidos, como o tecido adiposo (Gronthos et al. 2001, Lin et al. 2010), a polpa dentária (Gronthos et al. 2000), o cordão umbilical (Romanov et al. 2003, Wang et al. 2004) e a medula óssea (Friedenstein et al. 1970, Pittenger et al. 1999). A medula óssea é a fonte mais utilizada na medicina humana, sendo colhida por aspiração na crista ilíaca (Pittenger et al. 1999). Na medicina veterinária os principais sítios de coleta são a crista ilíaca, as esternébras, a tíbia e o fêmur (Kadiyala et al. 1997, Ringe et al. 2002, Del Carlo et al. 2007), sendo estes dois últimos os mais utilizados em experimentação animal (Bianco et al. 2001) e o realizado no presente trabalho.

A população de CTM presente na medula óssea é uma pequena porção das células coletadas, por isso é necessário a utilização da técnica de cultivo celular para expansão das CTM (Barry e Murphy 2004). Para acelerar o processo de isolamento, as células da medula óssea podem ser fracionadas com uma solução de gradiente de concentração como o Percoll ou Ficoll (Pittenger et al. 1999, Lodie et al. 2002, McBride et al. 2003, Semedo et al. 2009), no entanto para isolamento de CTM da medula óssea de ratos e camundongos não é necessário a utilização desta etapa, visto que não são observadas diferenças entre o tempo de plaqueamento inicial e a obtenção de CTM isoladas em cultura quando se compara a utilização de gradientes de concentração ou o plaqueamento direto de toda a população da medula óssea (Meirelles e Nardi 2003, Monteiro 2009, Semedo et al. 2009).

Utilizou-se a concentração inicial de 2×10^6 cel/cm², recomendada por Meirelles e Nardi (2003), que permitiu a confluência no 5º dia de cultivo. A concentração mínima para plaqueamento é de 1×10^4 cel/cm² (Pittenger et al. 1999) e a taxa de crescimento da cultura depende do tecido de origem, indivíduo e espécie doador e densidade celular de plaqueamento inicial (Bydlowski et al. 2009), no entanto, utilizando-se a mesma concentração inicial não observamos diferença nos resultados de Nardi e Meirelles (2006) e Monteiro (2009) em culturas de CTM da medula óssea de camundongos.

As células aderentes observadas no cultivo não representam exclusivamente CTM, pois fibroblastos, macrófagos e algumas células da linhagem hematopoiética podem aderir à placa de cultivo e crescer com características morfológicas semelhantes à CTM (Schrepfer et al. 2007, Bydlowski et al. 2009). A propriedade de aderência à placa de cultura não é suficiente para considerar a população celular purificada como CTM (Phinney et al. 1999), pois fibroblastos e macrófagos (Ortega et al. 2000, Domicini et al. 2006) aderem à placa de cultivo e permanecem até a décima passagem (Schrepfer et al. 2007).

As células com formato arredondado, em suspensão no meio de cultura, possivelmente células sanguíneas, células indiferenciadas da linhagem hematopoiética (CTH), endoteliais (CTE) e, até células mortas, foram removidas com trocas de meios e passagens, até se obter uma população celular com características morfológicas homogêneas (Martin et al. 1997, Bydlowski et al. 2009).

As avaliações realizadas em MEV e MFA exibiram com maior riqueza de detalhes a morfologia fibroblastóide e a distribuição das células em cultura, contudo, não são essenciais para comprovação da característica morfológica, uma vez que análise em microscópio invertido permite essa observação.

As etapas de caracterização celular foram realizadas após 15 a 20 dias do plaqueamento primário, em células da quarta passagem, pois após este período ocorre maior homogeneidade da cultura (Bydlowski et al. 2009) e as células da linhagem hematopoiética, que podem permanecer por 12 a 16 dias na cultura, são eliminadas (Martin et al. 1997).

Após cinco dias em meio osteogênico, as células mudaram da aparência fibroblástica alongada para uma forma arredondada, morfolologicamente semelhante a osteoblastos (Pittenger et al. 1999, Barry e Murphy 2004, Nardi e Meirelles 2006) e a partir do 7º dia foi observada matrix extracelular mineralizada, o que permite a comprovação da diferenciação precoce das CTM em osteoblastos, pois em presença ao β -glicerolfosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino no meio de cultivo CTM diferenciam-se em células com morfologia osteoblástica, apresentam atividade aumentada de fosfatase alcalina e depositam matrix extracelular mineralizada rica em cálcio (Barry e Murphy 2004, Nardi e Meirelles 2006, Ocarino et al. 2008, Tapp et al. 2009).

Os níveis altos de CD90 e CD54 encontrados, ambos acima de 90%, são os mais fidedignos para permitir a conclusão de que as células avaliadas pela citometria de fluxo são CTM, uma vez que, segundo Ocarino et al. (2008) e Kode et al. (2009), as células hematopoiéticas e fibroblastos, que podem estar presentes no cultivo, não expressam esses marcadores.

A presença de pequena porcentagem de expressão de CD45 (16,91%) observada na avaliação fenotípica demonstra a presença de células da linhagem hematopoiética (Donovan e Koretzky 1993, Phinney et al. 1999, Domicini et al. 2006) na quarta passagem, mesmo que em pequena quantidade, pois segundo Schrepfer et al (2007), estas células não são removidas suficientemente até a décima passagem.

A aderência em placa de cultura com morfologia fibroblastóide, imunofenotipagem e capacidade de diferenciação em cultura sob estímulos específicos, caracterizam como CTM as células cultivadas, na presente pesquisa, de acordo com o estabelecido pela ISCT. A obtenção destas células em um curto período de tempo associada à facilidade das técnicas de obtenção da medula óssea e manipulação da cultura celular são aspectos que referendam o protocolo apresentado.

Os nanocristais fluorescentes utilizados no presente trabalho apresentaram excelente marcação celular, podendo ser observados em amostras à fresco, obtidas diretamente da suspensão celular após tripsinização; e em *pellets* celulares incluídos em resina acrílica para histologia. O protocolo para marcação das células com *Quantum dots* foi rápido, de fácil execução e proporcionou ótimos resultados, apresentando alta fluorescência e mantendo a marcação das culturas incubadas com o Cell Labeling Qtracker 655® durante todo o período de execução do trabalho.

Para os grupos de pesquisa que não dispõem de animais transgênicos para o gene repórter *GFP* (*green fluorescent protein*), a dependência da aquisição de células *GFP* positivas e o custo das mesmas pode inviabilizar a pesquisa. Já a nanomarkação demonstrada neste trabalho, é um método simples e eficaz para as etapas *in vitro* e que ainda permite o acompanhamento das CTM em estudos *in vivo*.

CONCLUSÃO

O protocolo proposto permite a obtenção de CTM após 20 dias de cultivo, sendo viável para o transplante. As etapas de diferenciação e caracterização comprovam que as células cultivadas são células-tronco mesenquimais.

Os resultados do trabalho demonstram a eficácia dos procedimentos de coleta e cultivo de CTM de ratos Wistar e a viabilização desse tipo celular para estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo possível o acompanhamento destas células nos processos de migração celular e reparação de lesões de diferentes naturezas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais), FUNADESP (Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular) e, aos membros do Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo apoio técnico e financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asanuma, H. et al. (2010). Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells to Repair Kidney Injury. *The J. Urology*, 184(1):26-33.

Barros SVG et al. (2001). Auto-enxerto percutâneo de medula óssea II: reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. *Ciência Rural* 31:627-632.

Barry FP, Murphy JM (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The Inter. J. Bioch. Cell Biol.*, 36:568-584.

Bianco P, et al. (2001). Bone marrow stromal cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19:180-192.

Bobis S, Jarocha D, Majka M (2006) Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44:215-230.

Bydlowski SP, et al. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 31(supl1):25-35.

Cao Q, Benton RL, Whitemore SR (2002) Stem cell repair of central nervous system injury. *J. Neurosc. Res.*, 68:501-510.

Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, 9(5):641-650.

Caplan AI (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J. Pathology*, 217:318-324.

Castanheira P, et al. (2008). Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 71:644-650.

Deans RJ, Moseley AB (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potencial clinical uses. *Experimental Hematology*, 28:875-884.

Del Carlo RJ, et al. (2007) Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não a células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. *Veterinária e Zootecnia*, 14:204-215.

Del Carlo, RJ, Monteiro, BS, Argôlo Neto, NM (2008). Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. *Ciênc. Vet. Tróp.*, 11:167-169.

Domicini M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, 8:315-317.

Donovan JA e Koretzky GA (1993). CD45 and the immune response. *J. American Society of Nephrology*, 4:976-985.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4):393-403.

Gojo S, et al. (2003). In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Res.*, 288:51–59.

Gronthos S, et al. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Phys.*, 189:54-63.

Gronthos S, et al. (2000). Postnatal human dental stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. USA*, 97:13625-13630.

Gutiérrez-Fernández M, et al. (2011). Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience*, 175:394-405.

Haleem AM, et al. (2010). The clinical use of human culture-expanded autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted on platelet-rich fibrin glue in the treatment of articular cartilage defects: a pilot study and preliminary results. *Cartilage*, 1(4):253-261.

Halkos ME, et al. (2008). Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. *Basic. Res. Cardiol.*, 103:525-536.

Hashemi SM, et al. (2008). A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.*, 29(2):251-259.

Haynes T, Del Rio-Tsonis K. (2004). Retina repair, stem cells and beyond. *Curr. Neurovasc. Res.*, 1(3):231-9.

Hunt DP, et al. (2008). Effects of direct transplantation of multipotent mesenchymal stromal/stem cells into the demyelinated spinal cord. *Cell Transplant.*, 17(7):865-873.

Kadiyala S, et al. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.*, 6:125-134.

Kode JA, et al. (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 11:377-391.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res. Ther.*, 9:204-213.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:10711-10716.

Kuo TK, et al. (2008). Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology*, 134:2111-2121.

Lee KD, et al. (2004). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 40:1275-1284.

Lin CS, et al. (2010). Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol. Histopathol.*, 25(6):807-15.

Lodie TA, et al. (2002) Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng.*, 8(5):739-51.

Loffredo FS, et al. (2011). Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell*, 8(4):389-398.

Mambelli LI, et al. (2009). Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng. Part C Methods*, 15:87-94.

Martin I, et al. (1997). Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology*, 138:4456-4462.

McBride C, Gaupp D, Phinney DG (2003). Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real-time PCR. *Cytherapy*, 5:7-18.

Meirelles LS, Caplan AL, Nardi NB (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26:2287-2299.

Meirelles LS, Nardi NB (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br. J. Haematol.*, 123:702-711.

Minguell JJ, Conget P, Erices A (2000). Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33:881-887.

Moloney TC, et al. (2010). Potential of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for delivery of neurotrophins to the Parkinsonian rat brain. *Brain Res.*, 1359:33-43.

Monteiro BS (2009) Tratamento de defeitos críticos em calvária de camundongos com células-tronco mesenquimais associadas ou não ao plasma rico em plaquetas. Dissertation, Universidade Federal de Viçosa.

Monteiro BS, Argôlo-Neto, NM, Del Carlo RJ (2008). Terapia celular em reparação óssea - aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. *Ciênc. Vet. Tróp.*, 11(supl2):95-100.

Morigi M, et al. (2004). Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15:1794–1804.

Mota ACA, Soares MBP, Santos RR (2005). Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do hematologista. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 27:126-132.

Nakamura Y, et al. (2007). Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 25:612–620.

Nardi NB, Meirelles LS (2006). Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Exp. Pharmacology*, 174: 249-282.

Nauta AJ, Fibbe WE (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. *Blood*, 110:3499-3506.

Ocarino NM, et al. (2008). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide*, 19:320-325.

Ortega E, Garcia JJ, De la Fuente M (2000). Modulation of adherence and chemotaxis of macrophages by norepinephrine. Influence of ageing. *Mol. Cell. Biochem.*, 203:113-117.

Owen M (1988). Marrow stromal stem cells. J. Cell Sci. Suppl 10:63.

Pavlichenko N, et al. (2008). Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. Brain Research, 1233 (3):203-213.

Pelttaria K, Steckla E, Richter W (2008). The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. Injury, 39(suppl 1):58-65.

Perasso L, et al. (2010). Systemic administration of mesenchymal stem cells increases neuron survival after global cerebral ischemia in vivo (2VO). Neural Plast., 2010:1-5.

Phinney DG, et al. (1999). Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J. Cell. Biochemistry, 72:570-585.

Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. Stem Cells 25:2896-2902.

Pittenger MF, et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284:143-147.

Plotnikov AN, et al. (2007). Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart Circulation, 116:706-713.

Ringe J, et al. (2002). Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. Cell and Tissue Res., 307:321-327.

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells, 21:105-110.

Schrepfer S, et al. (2007). Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. Stem Cells and Development, 16:105-107.

Semedo P, et al. (2009). Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. *Einstein*, 7:469-479.

Seong JM, et al. (2010). Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed. Mater.*, 5:1-15.

Shake JG, et al. (2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann. Thorac. Surg.*, 73(6):1919-1926.

Shenfield F, et al. (2002). Stem cells. *Hum. Reprod.*, 17(5):1409-1410.

Sotiropoulou PA, et al. (2006). Reciprocal Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24:74-85.

Sun H, et al. (2007). In vitro and in vivo effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on polylactide-glycolic acid (PLGA) scaffolds. *Biomed. Eng. online* 6:41.

Tapp H, et al. (2009). Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp. Biol. Med.*, 234:1-9.

Teng YD, et al. (2002). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:3024–3029.

Toquet J, et al. (1999). Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J. Biomed. Mater. Res.*, 44:98-108.

Torquetti L, et al. (2007). Stem cells: potential source for retinal repair and regeneration. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 70:371-375.

Wan CD, et al. (2008). Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in rat orthotopic liver transplantation model. *Hep. Panc. Diseases. Intern.*, 7:29-33.

Wang HS, et al. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22:1330-1337.

Wang X, et al. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 422:897-901.

Yamada Y, et al. (2004). Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: Tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng.*, 10:955-964.

Yu J, et al. (2010). SDF-1/CXCR4-mediated migration of transplanted bone marrow stromal cells toward areas of heart myocardial infarction through activation of PI3K/Akt. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 55(5):496-505.

Zucconi E, et al. (2010). Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells Dev.*, 19:395-402.

ARTIGO II

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O TRATAMENTO DE LESÃO MEDULAR COMPRESSIVA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E SUCCINATO SÓDICO DE METILPREDNISOLONA, EM RATOS WISTAR

Neurological and histological evaluation in wistar rats treated with mesenchymal stem cells or methylprednisolone after spinal cord compression

**Estudo comparativo entre o tratamento de lesão medular compressiva
com células-tronco mesenquimais e succinato sódico de metilprednisolona,
em ratos Wistar**

RESUMO

Terapias efetivas para tratar a medula espinal após lesão permitindo a recuperação do paciente ainda estão em estudo. O tratamento mais utilizado em humanos, nas primeiras horas após a lesão medular, é a administração de altas doses de succinato sódico de metilprednisolona (SSMP). A terapia celular é considerada uma opção promissora para lesões do sistema nervoso central (SNC), sobretudo com a utilização de células-tronco (CT), com resultados satisfatórios em vários modelos experimentais. O presente trabalho comparou o tratamento utilizando SSMP e o transplante de CT mesenquimais (CTM), 3 horas após o trauma medular compressivo. As CTM foram obtidas da medula óssea de cinco ratos Wistar e caracterizadas segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT). A lesão espinal compressiva foi realizada com insuflação de 15µL do *cuff* do cateter de Forgat n.º 2 Fr. no espaço epidural T8 durante 5 minutos. Os animais foram alocados em 3 grupos distintos, com 10 animais em cada. O grupo controle (GC) recebeu solução PBS; o grupo metilprednisolona (GM) recebeu SSMP, e o grupo de CTM (GCT) recebeu 1×10^7 cels/mL de CTM indiferenciadas alógenas, todos por via endovenosa, 3 horas após a lesão espinal. Foi realizada avaliação motora com a escala de Basso-Beattie-Bresnehan (BBB), semanalmente, até o 35º dia após a lesão. Em seguida, foi realizada avaliação histológica da área da lesão, área total e percentual de área preservada nos fragmentos craniais e caudais à área de lesão macroscópica e no fragmento contendo a lesão macroscópica. Células contendo marcadores fluorescentes foram observadas no tecido medular afetado 35 dias após a lesão no grupo GCT. Os animais do grupo GCT apresentaram melhora funcional precoce (7 dias após lesão) e obtiveram índice total de recuperação duas vezes maior que os demais grupos. Adicionalmente, o percentual de tecido medular preservado na periferia da lesão foi maior no GCT. O grupo GM não apresentou diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados em relação ao controle. Conclui-se

que administração de CTM alógenas não acarreta rejeição, promove incremento da função motora e preserva o tecido nervoso após lesão espinal. Ademais, não demonstrou-se benefícios com a utilização do SSMP após o trauma raquimedular.

Palavras-chave: Trauma raquimedular, terapia celular, recuperação motora, corticóides

Neurological and histological evaluation in wistar rats treated with mesenchymal stem cells or methylprednisolone after spinal cord compression

ABSTRACT

Advances in medical and surgical care, current clinical therapies for spinal cord injury (SCI) have limited effectiveness. The most common treatment in humans, in the first hours after SCI, is the administration high doses of methylprednisolone (MP). However, studies show that does not aid in injury recovery and can cause complications due to the high dose used. Cell therapy is considered an option promising for lesions of the central nervous system, particularly stem cells after experimental animal models showed the transplantation of bone marrow-derived cells results in amelioration of the functional deficit in various neurological diseases. This work evaluated the transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs), 3 hours after SCI, compared with treatment using MP. MSCs from rat bone marrow were cultivated and expanded *in vitro*, characterized by flow cytometry and submitted to steogenic differentiation *in vitro*, until transplantation. Spinal cord injury was performed with 2-Fr Fogarty catheter after T9-T10 laminectomy. The animals were divided into three distinct groups. The control group (CG) received PBS intravenously 3 hours after spinal cord injury, group MP (GM) received MP, and the group of MSC (GCT) received 1×10^7 cells/mL MSCs from fourth to sixth passage of cell culture, both by the same route and time interval control. Motor evaluation was performed with the scale of Basso-Beattie- Bresnehan (BBB), weekly until day 35 after injury. Histological evaluation was performed of the lesion area, total area and percentage of the preserved fragments. MSC were observed in tissue 35 days after injury in group GCT, which showed functional improvement early (7 days after injury) and

obtained index total recovery of two times larger than the other groups. Additionally, the percentage of preserved tissue was higher in GCT. The GM group showed no differences in the parameters evaluated in compared to control. Administration of MSC is not alien cause rejection, promotes recovery of motor function and preserves tissue nervous after SCI. Also, there are no benefits with the use of MP after SCI.

Keywords: Spinal cord injury, locomotor function recovering, cell therapy, corticoids

INTRODUÇÃO

A lesão medular espinal acarreta redução ou perda da função motora, sensitiva e alterações viscerais autonômicas importantes, devido a danos no tecido nervoso e em seus elementos (Figoni, 1993; Blight, 2000; Furusawa et al., 2003).

A gravidade da lesão depende da intensidade, velocidade e duração de forças endógenas ou exógenas sobre a medula espinal (Bagley et al., 1999). A lesão de origem endógena decorre de extrusão ou protrusão de disco intervertebral, fraturas patológicas, anormalidades congênitas e instabilidade. Fatores exógenos incluem acidentes automobilísticos, lesões por armas de fogo, objetos penetrantes e quedas (Braund et al., 1990; Bagley et al., 1999; Guzen et al., 2009).

O trauma agudo acarreta déficits neurológicos pela interrupção direta das vias neuronais e por alterações subseqüentes que ocorrem por um período de horas até dias após a lesão primária. Frequentemente, a lesão primária não é suficiente para causar dano permanente, mas desencadeia eventos secundários progressivos que agravam a lesão inicial (Braund et al., 1990; Bergman et al., 2000a; Mallei et al., 2005). Essas lesões secundárias geram uma cascata de fenômenos biológicos, desencadeados pelo trauma inicial, que se caracterizam por: edema, alteração da perfusão e do fluxo sanguíneo, liberação de fatores de crescimento, influxo celular de cálcio, peroxidação lipídica e, por fim, necrose tecidual (Tator e Fehlings, 1991; Young, 1995).

Poucos recursos cirúrgicos e farmacológicos estão disponíveis e nenhum é capaz de reverter totalmente os danos neurológicos após a lesão espinal (Gebrin et al., 1997b). A terapêutica cirúrgica limita-se a descompressão da medula espinal, retirada de fragmentos e estabilização da coluna vertebral (Pratt et al., 1990). Na

terapia medicamentosa, estudos indicam que as lesões da medula espinal podem ser minimizadas por fármacos, desde que administradas em curto espaço de tempo após o trauma (Gebrin et al., 1997a). Fármacos moduladores das respostas endógenas à lesão estão sendo progressivamente introduzidas, a fim de interromper os mecanismos fisiopatológicos secundários à lesão medular (Ferrari et al., 1995; Carvalho et al., 2008).

Os corticostéóides, como a metilprednisolona, são amplamente utilizados no tratamento da lesão medular, apesar dos mecanismos de ação não serem bem entendidos, nem universalmente aceitos. Esta classe medicamentosa é considerada tratamento padrão após lesão medular aguda em humanos e pacientes veterinários (Rabchevsky et al., 2002; Arias et al., 2007), embora não seja consenso entre os profissionais (Hurlbert, 2000).

Frente às controvérsias e os resultados divergentes com fármacos, diferentes tipos de abordagens para o tratamento de pacientes com lesão espinal estão sendo estudados, destacando a terapia biológica, que consiste na utilização de células progenitoras (células-tronco), fatores genéticos e estimuladores de proliferação celular (Cízková et al., 2006; Cristante, 2007; Vitellaro-Zuccarello et al., 2007).

O transplante com células-tronco (CT) é uma das opções promissoras, devido a capacidade das CT em crescer e se diferenciar em componentes dos diferentes tecidos do organismo. O transplante com CT mesenquimais (CTM) tem sido utilizado experimentalmente com o objetivo de substituir o tecido nervoso lesionado ou promover um meio favorável à regeneração tecidual do sistema nervoso central [SNC] (Blight, 2000; Jeffery et al., 2001).

A utilização de precursores de oligodendrócitos obtidos a partir de células-tronco embrionárias é recente e os estudos estão em primeira fase de utilização em pacientes humanos (Sharp et al., 2010), e até se consolidarem os resultados, as CTM são o tipo celular empregado, devido seu potencial terapêutico e imunológico (Cho, et al., 2009). Adicionalmente, foi demonstrado pluripotência de CTM da medula óssea, que se diferenciam em linhagens de células neurais quando em condições apropriadas *in vitro*, como a adição de β -mercaptoetanol, forskolin ou fator de crescimento de fibroblastos [bFGF] (Woddbury et al., 2000; Lu et al., 2005; Deng et al., 2006).

O presente estudo comparou o transplante de CTM da medula óssea e o tratamento com SSMP através da avaliação da recuperação da função motora e modificações histológicas na medula espinal de ratos Wistar após lesão medular compressiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, pesando entre 250 e 300g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa para o estudo *in vivo*; e cinco ratos Wistar, machos, de 4 semanas de vida para coleta da medula óssea.

Grupos de cinco animais foram alojados em caixas, sob condições de umidade e temperatura controladas, fotoperíodo de 12 horas e receberam água e ração comercial *ad libitum* durante todo o período experimental.

O presente trabalho foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa sob o parecer n.º 2/2010.

Cultivo e preparação das células para transplante

As medulas ósseas dos cinco ratos foram coletadas dos fêmores e cultivadas com meio DMEM completo (meio base Dulbecco's Modified Eagle's Medium, baixa glicose, 3,7g/L de bicarbonato de sódio e 10-15mM HEPES-acid-free com adição de 20% de soro fetal bovino) em estufa à 37°C, com 5% de CO₂, até obtenção da sexta passagem. As culturas foram monitoradas, diariamente, com auxílio de microscópio óptico invertido de contraste de fase e o meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias.

Para o transplante das células, foram utilizadas células da quarta à sexta passagem, na concentração de 1×10^7 células/mL de PBS por animal. As células foram previamente incubadas por 60 minutos, a 37°C, com Qtracker Cell Labeling 655® (Invitrogen, California, EUA), segundo recomendações do fabricante.

As células marcadas foram tripsinizadas e centrifugadas para a obtenção do *pellet* celular. O *pellet* foi ressuspendido em PBS e alíquotas de 1×10^7 células foram

preparadas em 1,0mL de PBS, centrifugadas e armazenada em caixa de isolamento térmico até o momento da aplicação endovenosa.

Duas doses extras foram preparadas para avaliação à fresco em microscópio de fluorescência e para inclusão do *pellet* celular em resina acrílica (HistoResin® Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) para comprovar a eficácia da nanomarcagem. Nas amostras processadas, histologicamente, as lâminas foram contracoradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, CA, USA) para a identificação do núcleo e avaliadas por microscopia de fluorescência.

Células na quarta passagem foram submetidas aos testes de diferenciação osteogênica em meio DMEN enriquecido com 10% de SFB, 10^{-8} mol/mL de dexametasona, 5,0µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato, 10,0mmol/L de β -glicerofosfato. No sétimo, 14º, 21º e 30º dias após início da diferenciação as culturas foram fixadas em paraformaldeído e coradas com Vermelho de Alizarina e Von Kossa para identificar deposição de cálcio.

Na imunofenotipagem, as amostras de células da quarta passagem foram incubadas com os anticorpos primários anti-CD45 clone 69 mouse, anti-CD90 clone Ox-7 mouse, anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse e anti-CD54 clone 1A29 mouse (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) por 30 minutos à 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo Alexa 488 sob as mesmas condições anteriores. As amostras foram analisadas usando citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®.

Lesão medular

Os animais receberam analgesia pré-empitiva com fentanil (0,3mg/Kg/IM), foram sedados com Diazepan (2,5mg/Kg/IP) e anestesiados com Isoflurano em circuito anestésico com oxigênio 100%. Foi realizada antimicrobianoprofilaxia com enrofloxacina (10mg/Kg) por via intramuscular.

Após a tricotomia ampla do dorso e da antissepsia da pele com solução de Povidine®, foi realizada incisão de 5cm na linha média dorsal, tendo como referência os processos espinhosos da oitava vértebra torácica (T8) à primeira vértebra lombar (L1). O tecido subcutâneo foi incisado, seguido do afastamento subperiosteal da musculatura paravertebral, com uso de lâmina de bisturi n.º 11.

A nona e a décima vértebras torácicas (T9 e T10) foram identificadas por meio da contagem dos arcos costais e, sob magnificação com microscópio cirúrgico, foi realizada laminectomia da vértebra torácica nove (T9) e dez (T10) com broca trefina de 4mm de diâmetro em perfuratriz elétrica. A duramater foi mantida íntegra e a medula espinal foi exposta e avaliada sob magnificação para comprovar integridade após a remoção do arco dorsal.

Para promover a lesão espinal compressiva, um cateter de Forgaty n. 2 Fr foi introduzido no espaço epidural e conduzido, cranialmente, até o segmento medular T8-T9. O *cuff* do cateter foi insuflado com 15µL de solução salina e mantido desta forma por cinco minutos, realizando a compressão da medula.

O cateter foi removido após esvaziamento do *cuff* seguindo-se a aproximação da musculatura e tecido subcutâneo em planos anatômicos com fio vicril 4-0, em padrão simples contínuo e dermorrafia com mononáilon 3-0, em padrão colchoeiro.

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

Após a cirurgia, os animais foram alojados em trios para reduzir o estresse de isolamento e receberam analgesia com morfina (5mg/Kg/SC), a cada 4 horas, por 3 dias. Os animais permaneceram no biotério sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo anteriores ao procedimento cirúrgico.

Grupos e tratamentos

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos de 10 animais e receberam tratamentos distintos após a indução da lesão:

- Grupo Controle (GC): administração de 1mL de solução PBS, por via endovenosa, três horas após a lesão;
- Grupo Metilprednisolona (GM): administração de 1mL (30mg/Kg) de succinato sódico de metilprednisolona (SSMP - Solu-Medrol®, Pfiser, Puurs, Bélgica), por via endovenosa, três horas após a lesão;
- Grupo CTM (GCT): administração de 1×10^7 células/mL de PBS, por via endovenosa, três horas após a indução da lesão espinal.

Todos os animais foram acompanhados diariamente por 35 dias após a lesão espinal. Neste período foi realizada a avaliação da função motora semanalmente. Ao

35º dia, após a eutanásia dos animais, foi coletada a medula espinal para avaliação histológica.

As doses contendo 1×10^7 células/mL de PBS foram ressuspensas no momento de aplicação e injetadas na veia lateral da cauda ou safena lateral, de acordo com a facilidade de apresentação. Mesmo acesso foi utilizado para aplicação do PBS e SSMP.

Avaliação Neurológica

A avaliação da função motora foi realizada anteriormente à indução da lesão espinal, 24 horas pós-lesão e, semanalmente, até o 35º dia pós-lesão, utilizando-se a escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).

Dois avaliadores observaram os movimentos das articulações coxofemoral, fêmoro-tíbio-patelar, tíbio-társica, a posição do tronco, cauda e dos membros pélvicos durante a caminhada dos animais em campo aberto e, classificaram os animais no escore de zero a 21, segundo Basso et al. (1995), sendo zero o correspondente à ausência total de movimentos e 21 à presença de movimentos normais dos membros pélvicos.

Após a lesão medular, pressão manual da bexiga foi realizada oito vezes ao dia até o restabelecimento do reflexo de esvaziamento da bexiga. Os ratos foram monitorados quanto à evidência de hematúria, infecção do trato urinário ou outros sinais de doença sistêmica.

Avaliação Histológica

No 35º dia pós-lesão (dplm), após a eutanásia dos animais em câmara anestésica com isoflurano, foram realizadas infusões intracardíacas de solução fisiológica (NaCl 0,9%) heparinizada, seguida de solução de Karnovisk (paraformaldeído 4% em tampão fosfato, pH 7,4 e glutaraldeído 2,5%). Posteriormente, a medula foi cuidadosamente removida do canal espinal e um fragmento de 5 cm de comprimento, contendo a lesão macroscópica ao centro, foi mantido em solução de Karnovisk a 4°C por 24 horas. Transcorrido esse período, o material foi acondicionado em álcool 70º e processado para avaliação histológica.

Em cada grupo, dez amostras de medula foram coletadas, das quais oito foram incluídas em paraplast e cortadas com espessura de 5µm transversalmente ao plano

sagital mediano, em duplicata, para coloração de Hematoxilina-Eosina; e duas amostras incluídas em resina acrílica e cortadas, transversalmente, com espessura de 3µm para avaliação em microscopia de fluorescência, objetivando verificar a presença de fluorescência das células transplantadas.

Previamente à inclusão, as dez amostras de cada grupo foram seccionadas em três fragmentos: porção cranial à lesão macroscópica, porção da lesão e porção caudal à lesão macroscópica. O fragmento da lesão foi dividido em dois a partir do epicentro da lesão.

As lâminas foram avaliadas e fotografadas em microscópio ótico Nikon Eclipse 80i (Nikon *Instruments Co.*, Melville, EUA) para posterior análise no software Image-Pro Plus 4.5 (*Media Cybernetics*, Bethesda, EUA).

As imagens para análise foram obtidas nas secções transversais da medula espinal, sendo que para cada animal obteve-se: 12 secções da porção cranial; 24 da lesão; e 12 da porção caudal, todas com intervalo de 50µm entre os cortes.

Foi realizado estudo morfométrico com obtenção de dados da área total (área seccional externa total da medula), área lesionada (contida dentro da total, composta por formação cística, cavitação, gliose, edema axonal e perda da organização tecidual) e percentual de tecido preservado (relação da área preservada sobre a total) em cada lâmina.

As lâminas foram adicionalmente avaliadas em microscópio fluorescente para identificação de fluorescência vermelha no comprimento de onda 655, indicativo da presença das células transplantadas com o nanocristal fluorescente (Qtracker 655®).

Análise estatística

Os valores numéricos da avaliação neurológica da recuperação da função motora através do teste BBB, nos momentos 1º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dias pós-lesão, em cada um dos grupos (GC, GM e GCT), foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors e de homogeneidade de variâncias de Cochran e Bartlett.

Foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, caso houvesse diferença significativa entre os grupos ou dentro de um mesmo grupo.

Os valores de área total, área de lesão e percentual de tecido preservado foram avaliados pelos mesmos testes anteriores.

Foi adotado o nível de significância de 0,05 ($\alpha=5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes e representados por asterisco (*).

RESULTADOS

As células cultivadas demonstraram aparência fibroblastóide em cultura (figura 1A e 1B), 48 horas pós-plaqueamento primário, permanecendo durante todo o período de avaliação *in vitro*. Foi observada modificação morfológica e calcificação da matriz nas amostras submetidas à diferenciação osteogênica nas colorações por Von Kossa (figura 1C) e Vermelho de Alizarina (figura 1D).

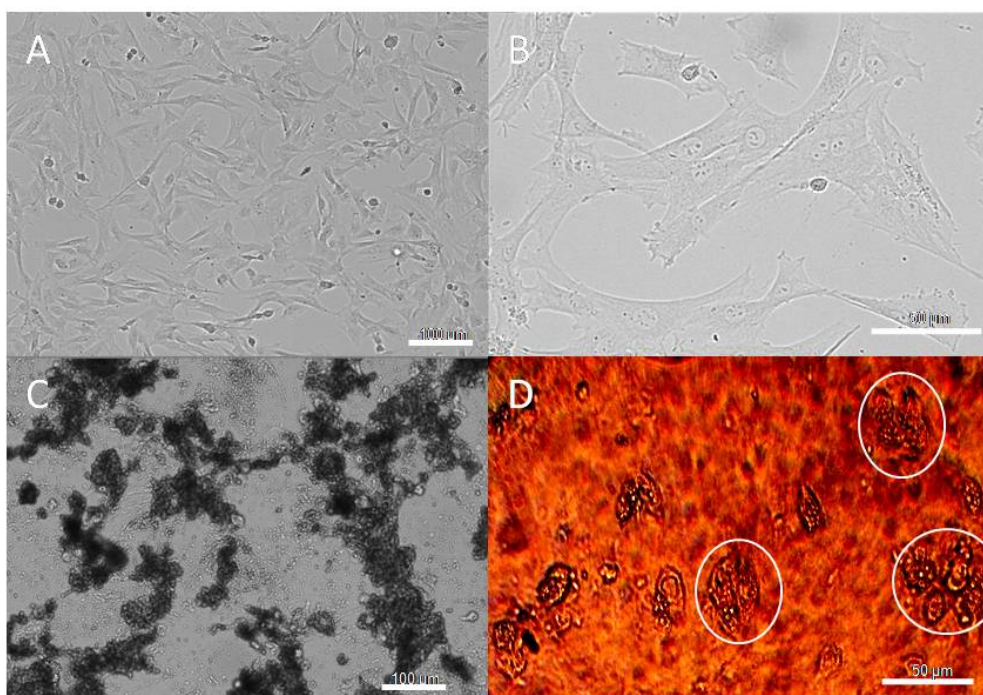


Figura 1. Fotomicrografias das CTM indiferenciadas *in vitro* com distribuição homogênea e morfologia fibroblastóide (A e B) e sob diferenciação osteogênica exibindo calcificação da matriz extracelular (regiões negras) evidente sob coloração por Von Kossa (C) e ninhos de células arredondadas (círculos) semelhantes a osteoblastos na coloração por Vermelho de Alizarina (D).

As CTM da quarta passagem submetidas à imunofenotipagem com os anticorpos anti-CD45, anti-CD54, anti-CD73 e anti-CD90 demonstraram expressão negativa para o marcador de superfície CD45 (83,09%) e positiva para os

marcadores CD54 (93,83%), CD73 (70,44%) e CD90 (98,82%) na avaliação por citometria de fluxo, conforme a figura 2 ilustra.

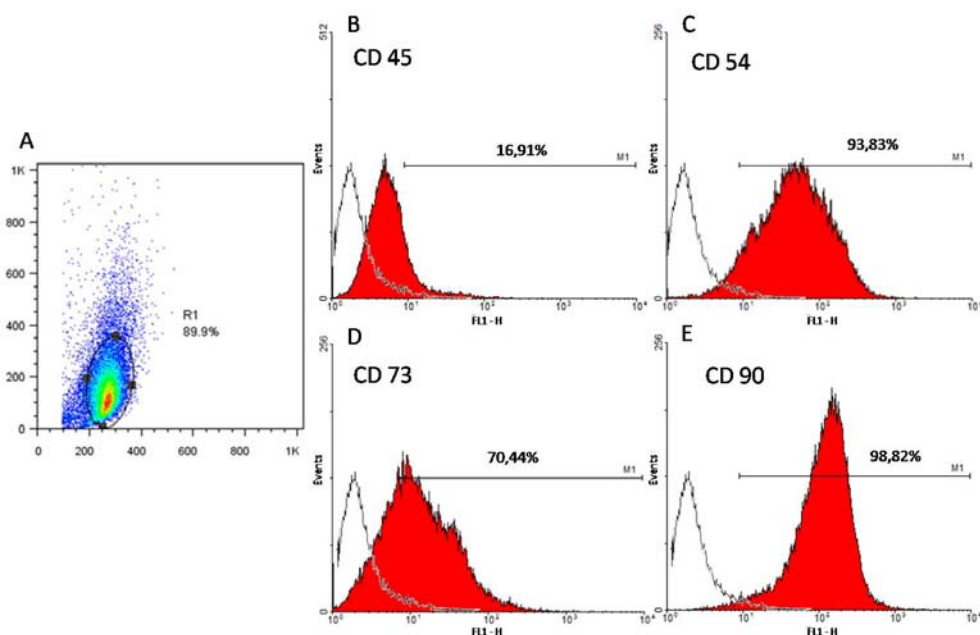


Figura 2. Caracterização das CTM de ratos Wistar por citometria de fluxo. A população escolhida para análise apresentou 89,9% de homogeneidade. A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos vermelhos) esta comparada com os isotipos controle (gráficos abertos) e representada em valores percentuais. O número de células analisadas (eventos) esta representado no eixo y e a intensidade no eixo x.

As células previamente marcadas com o Q-tracker 655® apresentaram fluorescência citoplasmática (cor vermelha) no momento anterior ao transplante, tanto nas amostras à fresco (figura 3A) quanto no *pellet* processado histologicamente (figura 3B).

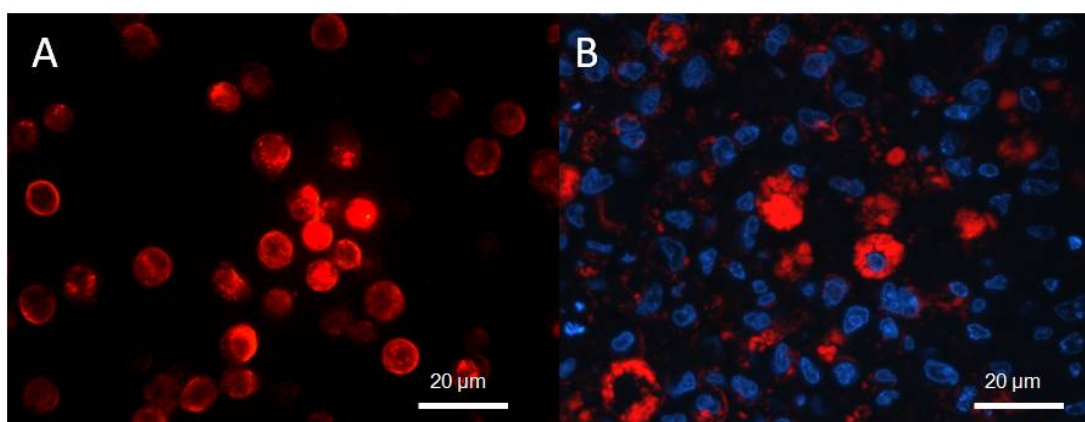


Figura 3. Fotomicrografia das CTM após nanomarkação com Q-tracker®. A) demonstra as células em suspensão de uma dose de 1×10^7 cel/mL exibindo fluorescência vermelha. B) Células contendo os cristais fluorescentes vermelho após processamento histológico em resina. Os núcleos foram contra corados com DAPI.

Trinta animais operados (83,3%) apresentaram paraplegia simétrica, os quais compuseram o *n* amostral do presente trabalho. Seis animais operados (16,7%) apresentaram manifestações clínicas assimétricas, sendo quatro com monoplegia pélvica e dois com paraparesia, portanto não foram incluídos nas análises.

Os resultados da avaliação da função locomotora, segundo a escala de BBB dos ratos, no 1º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dplm, distribuídos em cada grupo, estão apresentados em valores absolutos (tabela 1), média e desvio padrão (tabela 2).

Tabela 1. Distribuição dos valores do teste de BBB dos 30 animais, divididos em cada grupo, no dia antes da lesão medular (pré-cirúrgico), 1º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dia pós-lesão medular.

Grupo	Animal	Pré-cirúrgico	1º dplm	7º dplm	14º dplm	21º dplm	28º dplm	35º dplm
GC	1	21	0	1	2	3	4	5
	2	21	0	0	2	3	4	6
	3	21	0	0	6	6	7	7
	4	21	0	1	3	5	5	6
	5	21	0	4	7	9	9	11
	6	21	0	0	3	3	4	5
	7	21	0	0	0	3	4	6
	8	21	0	1	2	3	5	6
	9	21	0	1	2	3	5	6
	10	21	0	1	3	4	5	5
GM	1	21	0	1	4	4	6	6
	2	21	0	1	3	4	5	7
	3	21	0	2	3	3	5	6
	4	21	0	2	3	3	5	6
	5	21	0	3	6	8	11	13
	6	21	0	1	2	3	5	6
	7	21	0	1	2	4	6	6
	8	21	0	1	4	4	5	6
	9	21	0	1	2	3	5	6
	10	21	0	1	2	4	6	7
GCT	1	21	0	1	3	6	8	13
	2	21	0	2	6	6	7	9
	3	21	0	2	6	8	9	11
	4	21	0	3	6	8	11	14
	5	21	0	3	4	6	11	14
	6	21	0	2	4	6	8	10
	7	21	0	3	4	6	8	10
	8	21	0	2	4	6	7	10
	9	21	0	3	6	7	11	15
	10	21	0	1	6	7	11	14

Nenhum animal apresentou infecção da ferida cirúrgica ou alterações de comportamento e apetite durante todo o período de avaliação após a indução da lesão medular.

No sétimo dia de avaliação, o grupo GCT demonstrou melhora da função locomotora superior ao grupo controle. Observou-se que o grupo GCT apresentou diferença com o grupo GM, a partir do 21º dia de avaliação pós-lesão.

Ao final do tratamento, o grupo GCT obteve o melhor escore de recuperação da função motora, com diferença estatística em comparação com os grupos GC e GM. Além disso, o valor médio do escore atingido pelos grupos GC e GM, no 35º dplm, foi semelhante ao apresentado pelo grupo tratado com as CTM, no 21º dplm (tabela 2 e figura 4). Não foi observada recuperação total da função motora (escore 21 da escala BBB) em nenhum dos grupos.

Nas primeiras 24 horas pós-lesão, todos os animais apresentaram hematúria, que perdurou em 85% dos animais por 48 horas, sem, no entanto, haver diferença estatística entre os grupos.

Os animais apresentaram retenção de urina com distensão da bexiga, necessitando de massagem para induzir micção. Essa alteração perdurou em todos os animais nas duas primeiras semanas após a lesão medular, independente do grupo de tratamento. Após esse período os animais apresentaram moderada distensão da bexiga e retornaram a micção sem auxílio, demonstrando que a lesão medular foi moderada. Não foi observada nenhuma correlação com os tratamentos.

Tabela 2. Distribuição da média e desvio padrão da avaliação funcional de BBB no 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dia pós-lesão medular (dplm) em cada grupo.

Grupo	7º dplm	14º dplm	21º dplm	28º dplm	35º dplm
GC	0,90 $\pm$ 1,19 b*C ^{1,2}	3,00 $\pm$ 2,05 aBC	4,20 $\pm$ 1,98 bAB	5,20 $\pm$ 1,61 b*AB ¹	6,30 $\pm$ 1,76 b*A ²
GM	1,40 $\pm$ 0,69 abC ^{1,2}	3,10 $\pm$ 1,28 aBC ³	4,00 $\pm$ 1,49 bBC	5,90 $\pm$ 1,85 bAB ¹	6,90 $\pm$ 2,18 bA ^{2,3}
GCT	2,20 $\pm$ 0,78 a*D ^{1,2}	4,90 $\pm$ 1,19 aCD ³	6,60 $\pm$ 0,84 aBC	9,10 $\pm$ 1,72 a*AB ¹	12,00 $\pm$ 2,21 a*A ^{2,3}

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, segundo o teste de Kruskal-Wallis (p<0,05).

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si, segundo o teste de Kruskal-Wallis (p<0,05).

* indica p<0,01 na coluna.

Números sobrescritos iguais indicam p<0,01 na linha.

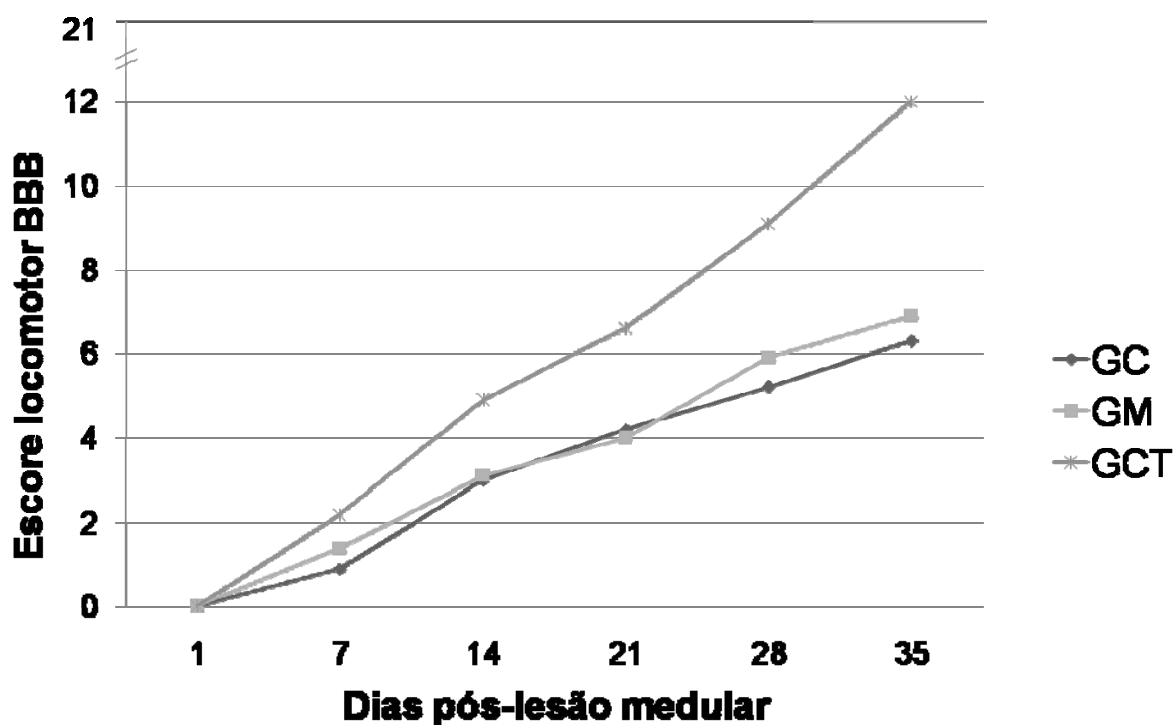


Figura 4. Recuperação da função motora, representada através dos valores médios da escala de BBB de cada grupo, em intervalo semanal, ao longo de 35 dias após a lesão medular.

Na avaliação microscopia foi observada necrose extensa e grave nos fragmentos da lesão, independente do grupo, e presença de degeneração axonal e cavitação nos segmentos adjacentes (fragmento cranial e caudal) ao epicentro da lesão,

A avaliação morfométrica da medula foi realizada ao longo de $1,4 \pm 0,2$ mm ($n=30$) de comprimento e, as imagens obtidas das secções transversais de cada fragmento (cranial, lesão e caudal) estão apresentadas na figura 5.

Os valores médios de área de lesão e percentual de tecido preservado, dos oito animais de cada grupo, apresentaram diferença significativa entre o tratamento com células-tronco e os demais grupos (tabela 3 e figura 6).

A área de lesão obtida nos fragmentos com lesão macroscópica não apresentou diferença entre os grupos avaliados (tabela 3 e figura 6). Embora não tenha sido observada diferença quanto à área da lesão neste fragmento, o grupo GCT apresentou a maior porção de tecido preservado (tabela 4).

No fragmento cranial à lesão macroscópica, o grupo GCT apresentou diferença quanto à área de lesão (tabela 3) e percentual de área preservada (tabela 4) em relação ao GC e grupo GM. Não houve diferença entre o grupo tratamento com SSMP e o grupo controle.

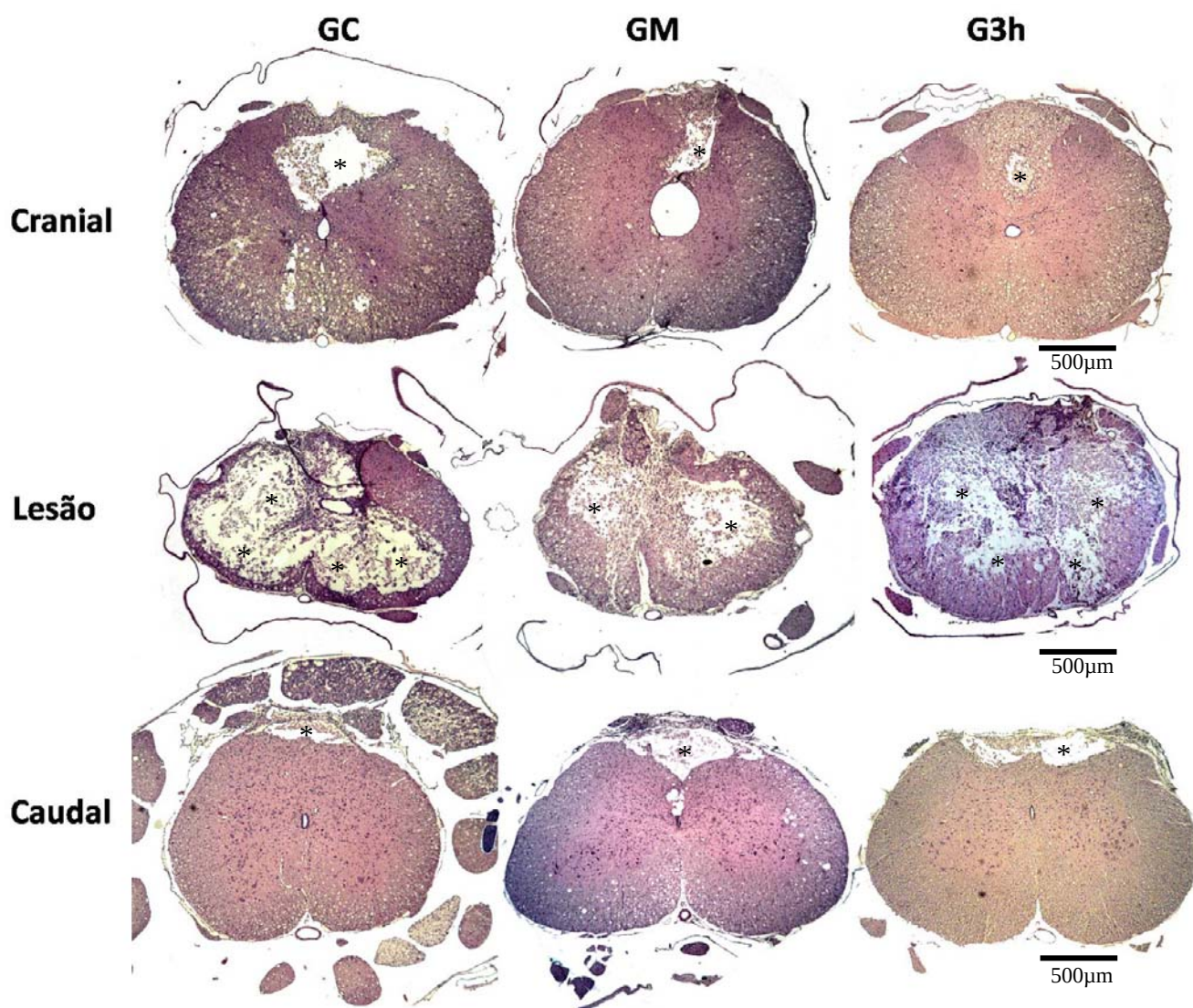


Figura 5. Imagens dos fragmentos cranial, lesão e caudal, dos diferentes grupos avaliados, no 35º dplm. Os fragmentos da lesão em todos os grupos apresentam malácia extensa e grave da substância branca e cinzenta. Nos fragmentos craniais e caudais a lesão concentra-se no funículo dorsal. Locais marcados com * representam área de cavitação e formações císticas. H&E.

A média das áreas de lesão, mensuradas no fragmento caudal à lesão macroscópica, foi menor no GC, apresentando diferença com os dois outros grupos de tratamento. No entanto, o percentual de área preservada deste fragmento não diferiu do grupo tratado com as CTM (tabela 4).

Tabela 3. Distribuição das médias e desvio padrão da área de lesão (mm²) de cada fragmento analisado, por grupo de tratamento.

Grupo	Cranial	Lesão		Caudal
		Lesão I	Lesão II	
GC	0,355±0,168 a ¹	0,832±0,338 a	0,873±0,301 a	0,068±0,059 a ^{1,2}
GM	0,315±0,161 a ²	0,873±0,300 a	0,833±0,337 a	0,161±0,132 b ¹
GCT	0,103±0,120 b ^{1,2}	0,778±0,328 a	0,753±0,350 a	0,107±0,042 b ²

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, segundo o teste de Kruskal-Wallis (p<0,05). Números sobrescritos iguais indicam p<0,01 na coluna.

Tabela 4. Distribuição das médias e desvio padrão do percentual de área preservada de cada fragmentos analisado, por grupo de tratamento.

Grupo	Cranial	Lesão		Caudal
		Lesão I	Lesão II	
GC	85,21±6,63 a ¹	38,32±16,47 a ¹	27,88±20,17 a ^{1,2}	97,61±2,16 a
GM	87,95±5,02 a ²	27,89±20,15 b ^{1,2}	38,25±16,44 b ¹	94,18±4,00 b
GCT	95,49±5,38 b ^{1,2}	42,63±14,50 b ²	44,95±14,82 b ²	96,29±1,48 a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, segundo o teste de Kruskal-Wallis (p<0,05). Números sobrescritos iguais indicam p<0,01 na coluna.

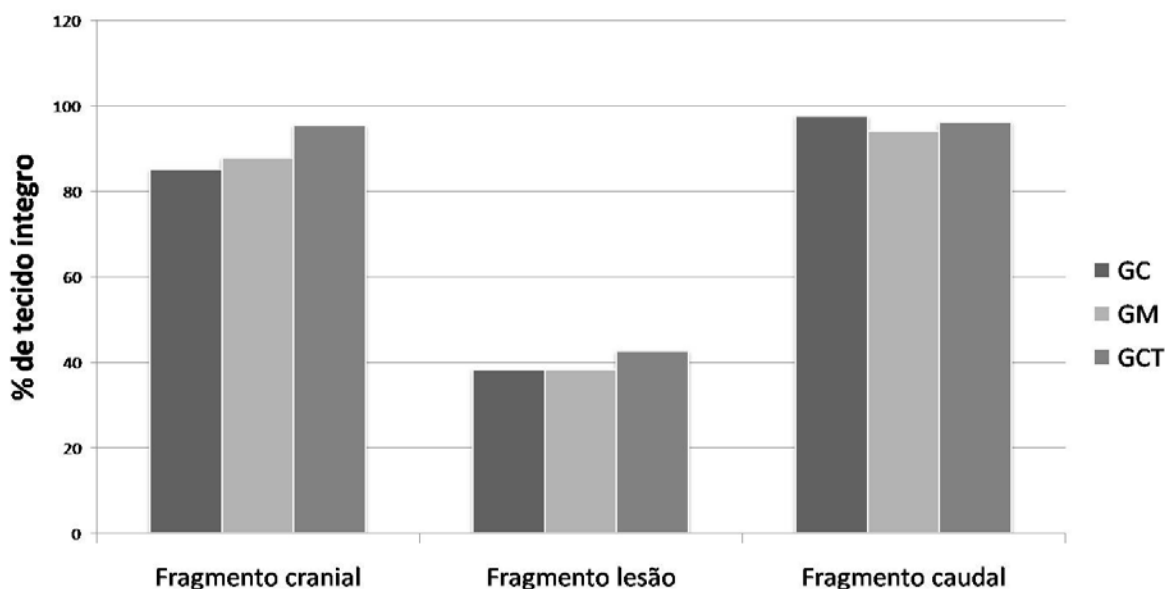


Figura 6. Distribuição, por fragmento avaliado, das médias de percentual de área preservada nos diferentes grupos estudados.

Na avaliação das lâminas incluídas em historesina, sob microscopia de fluorescência, observou-se a presença de fluorescência vermelha em células presentes na periferia da lesão e, em maior quantidade, nas áreas da lesão (figura 7), comprovando que as CTM transplantadas, por via endovenosa, no grupo GCT, atingiram a lesão presente na medula espinal.

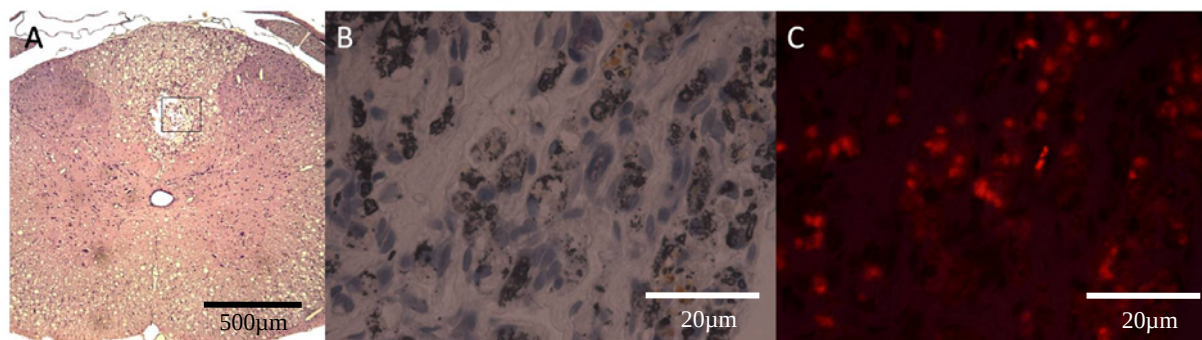


Figura 7. Fotomicrografias da área de lesão sob diferentes formas de microscopia. (A) demonstra a área de cicatrização glial e cavitação avaliada. H&E. (B) maior aumento da área de lesão com células gliais. (C) evidencia a presença de células com fluorescência vermelha na área de lesão espinal, quando avaliadas por imunofluorescência.

DISCUSSÃO

No presente estudo, isolou-se células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea de ratos Wistar, promovendo a expansão e caracterização destas células para aplicação em modelo de lesão espinal compressiva. As células cultivadas apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência a placa de cultura, como descrito por Pittenger et al. (1999), contudo, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos podem apresentar aderência a placa de cultivo, sendo esta característica insuficiente para classificar as células como CTM (Dominici et al., 2006). As CTM da medula óssea apresentam expressão positiva dos marcadores celulares de superfície CD13, CD29, CD54, CD73, CD 90, CD 106 e Stro-1, e não expressão marcadores de células hematopoiéticas (CD14, CD34, CD45) [Martin et al., 2002, Dominici et al., 2006; Meirelles e Nardi, 2009; Rho et al., 2009], o que demonstra que o padrão imunofenotípico obtido no presente trabalho está de acordo com este critério de classificação para CTM. O critério mais importante para classificação é a capacidade de diferenciação em linhagens mesodermal (osso, cartilagem e tecido adiposo) [Morrison et al., 1997; Kopen et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Dominici et al., 2006; Nardi e Meirelles, 2006], que foi obtida quando as

células foram expostas ao meio de diferenciação osteogênico. Em conjunto, todos os critérios para classificação de CTM foram obtidos e demonstrados no estudo, comprovando que as células transplantadas foram CTM.

Após a indução da lesão espinal, a apresentação neurológica dos animais foi compatível com lesão medular grau B, da escala da *American Spinal Injury Association* (ASIA), que indica lesão incompleta da medula com sensibilidade preservada, mas nenhuma função motora presente abaixo do nível da lesão neurológica (ASIA, 2006). Todos os animais utilizados no estudo apresentaram paraplegia no pós-cirúrgico imediato e no primeiro dplm. A sensibilidade profunda permaneceu em todos os animais, o que indica lesão moderada e com potencial de reversão, pois a perda da dor profunda resulta em prognóstico desfavorável devido lesão grave e, geralmente, irreversível (Bergman et al., 2000b).

Todos os animais apresentaram melhora da função motora, embora em nenhum grupo tenha sido obtida a pontuação máxima (21) da escala de BBB. A lesão promovida com essa técnica, descrita previamente por Vanický et al. (2001), resulta em paraplegia completa seguida de recuperação progressiva e espontânea, porém parcial, da função motora após 4 semanas, o que torna esse modelo, de extreme interesse para avaliar a eficácia de estratégias terapêuticas no trauma espinal (Foret et al., 2010).

Todos os animais apresentaram arreflexia da musculatura detrusora da bexiga e espasticidade do músculo esfíncter uretral externo, evidenciadas pela ausência de micção espontânea e distensão exagerada da bexiga, responsiva a massagem vesical suave para induzir a micção, por duas semanas pós-lesão, independente do grupo de tratamento. O reflexo de micção retorna em torno de 10 dias após a lesão, contudo a necessidade de realização da massagem é determinada de acordo com a necessidade individual de cada animal (Ramsey et al., 2010). Não foi necessário realizar sedação nem cateterização vesical (Krassioukov e Weaver, 1995) para o manejo do quadro de bexiga neurogênica nos animais após a lesão espinal.

Além da alteração motora e vesical, os animais apresentaram déficit proprioceptivo até o final do período de avaliação. Esse achado foi observado por Silva et al. (2008), e condiz com a afirmação de Thomas (2000) de que este é o primeiro parâmetro clínico afetado no trauma raquimedular e o último a apresentar recuperação.

A utilização do SSMP 3 horas após o trauma medular, está de acordo com as recomendações do *National Acute Spinal Cord Injury Study* (NASCIS), cujos resultados de estudos controlados e multicêntricos (NASCIS I, II e III), realizados a partir de 1979, recomendam o uso da metilprednisolona dentro das primeiras oito horas após lesão medular traumática (Ducker e Zeidman, 1994).

A utilização da metilprednisolona, em altas doses, tem sido correlacionada com efeito benéfico na recuperação funcional de ratos com lesão medular (Tebet et al., 2003), melhora na perfusão microvascular, no metabolismo medular e redução da área da lesão (Constantini e Young, 1994). Contudo, o grupo tratado com SSMP não apresentou diferença significativa quanto a recuperação motora, em nenhum momento da avaliação, em comparação ao grupo controle. Silva et al. (2008) também não observaram indícios de efeitos diferenciados na avaliação neurológica em animais tratados com SSMP quando comparados com grupo controle.

A análise morfométrica do GM permite inferir que a utilização do SSMP não promoveu inibição da peroxidação lipídica, diminuição da degeneração axonal, prevenção de isquemia e reversão do acúmulo de cálcio intracelular, mecanismos de ação propostos para a referida medicação (Young e Flamm, 1982; Constantini e Young, 1994), que resultariam em menor dano tecidual (Hall, 1992; Young, 1993). Vialle et al. (2007) também não observaram redução significativa das alterações histológicas decorrentes do trauma raquimedular em ratos tratados com SSMP e, embora Tebet et al. (2003) e Carvalho et al. (2008), tenham descrito resultados satisfatórios quanto a recuperação funcional, não houve correlação com os achados histológicos, que não diferiram do grupo controle.

Os resultados obtidos não permitem inferir sobre a vantagem de utilização do SSMP, pois em diferentes estudos, tanto experimentais quanto clínicos, resultados contraditórios são observados (Hurlbert 2000; Hurlbert, 2001; Vialle et al., 2007), demonstrando que ainda não estão compreendidos os mecanismos de ação deste medicamento, o tempo ideal de administração após a lesão espinal e nem o real benefício ao paciente.

A melhora significativa observada no sétimo dia de avaliação nos animais do grupo tratado com CTM demonstra contribuição positiva e precoce no processo de recuperação da função motora. Essa contribuição pode ocorrer pela substituição de células neuronais perdidas ou em degeneração, ativação de mecanismos

compensatórios do próprio tecido, estimulação de células-tronco endógenas do tecido alvo (Chopp et al., 2000), secreção de fatores neuroprotetores e citocinas anti-inflamatórias (Cho et al., 2009). Embora tenha sido observado células com fluorescência vermelha na área da lesão, a presença de cavitação e malácia extensa e grave no epicentro da lesão observada em todos os grupos, inclusive no GCT, permite inferir que a ação parácrina foi a principal contribuição das CTM, controlando a lesão secundária, o que resultou em menor área de lesão total e melhor recuperação da função motora.

A maior área de lesão observada foi do grupo controle, pois como descrito por Lu et al. (2000) e Vialle et al. (2007), quando não há tratamento para impedir a progressão das lesões secundárias ao trauma raquimedular, o dano tecidual aumenta em extensão.

Ao empregar o SSMP três horas após o trauma inicial, não houve diferença, quanto os parâmetros área de lesão e percentual de tecido preservado, com o grupo controle, o que contradiz a recomendação do NASCIS de utilização do SSMP até oito horas após o trauma inicial, na tentativa de limitar a progressão das lesões secundárias. O principal efeito sugerido do SSMP e outros corticóides é a capacidade de inibir a peroxidação lipídica por radicais livres, diminuindo a degeneração do axônio (Brown e Hall, 1992; Constantini e Young, 1994); aumentar o fluxo sanguíneo e a perfusão no tecido medular, prevenindo a isquemia e promovendo a reversão do acúmulo de cálcio intracelular (Anderson et al., 1982; Hall, ED, 1992; Bracken et al., 1993), quando empregados em altas doses nas primeiras horas após o trauma inicial. No entanto, esses efeitos não parecem ter ocorrido com a administração do SSMP 3 horas após o trauma.

Pode-se deduzir que não houve benefício com a aplicação do SSMP, pois somado à falta de incremento na recuperação motora, não houve efeito protetor do tecido nervoso - evidenciada pela ausência de diferença estatística nos dados morfométricos em relação ao controle - assim como relatado por Kaptanoglu et al. (2000), Haghighi et al. (2000), Merola et al.. (2002), Rabchevsky et al (2002) e Vialle et al. (2007).

Pode-se inferir que as CTM impediram o avanço das alterações secundárias à lesão medular, promovendo maior taxa de recuperação funcional e preservação do

tecido nervoso, pois a área total de lesão foi menor no grupo GCT do que nos outros grupos avaliados.

A contribuição das CTM para a diminuição da área de lesão e recuperação precoce e melhor da função motora é correlacionada a secreção de fatores de crescimento e citocinas como o NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*) (Kurozumi et al., 2004, Lu et al., 2005; Nomura et al., 2005) e ainda estimulam as células da glia a produzirem fatores neurotróficos como NGF e BDNF (Majunder et al., 1998; Mahmood et al., 2002; Wang et al., 2002).

A área de lesão nos fragmentos da lesão macroscópica não apresentou diferença entre os três grupos avaliados. Ankeny et al. (2004) e Urdzíkova et al. (2006) também não encontraram diferenças de área total de lesão entre grupos tratados com CTM e tratados com solução salina. No entanto observaram que grupos que receberam CTM apresentaram maior percentual de substância branca preservada, e correlacionaram com a melhora funcional dos membros pélvicos. Semelhante ao observado por estes autores, obteve-se, no presente trabalho, porcentagem de tecido preservado significativamente maior no grupo GCT na área da lesão macroscópica.

Embora seja creditado às células-tronco a capacidade de reparar a área de lesão por promover a formação de novas células da linhagem neural (Sanchez-Ramos, 2002; Mezey et al., 2003), Cho et al. (2009) observaram que poucas células transplantadas tornam-se células neurais diferenciadas, e que esta diferenciação não foi uniformemente distribuída entre os tipos de células do SN, existindo maior diferenciação para astrócitos e oligodendrócitos do que para neurônios. Essas evidências corroboram para concluir que o efeito parácrino, sobretudo neuroprotetor, é a principal contribuição das CTM nas lesões da medula espinal.

A capacidade que as CTM possuem para atingir o tecido lesionado após aplicação sistêmica foi demonstrada pela presença de células marcadas com os nanocristais fluorescentes (Q-tracker®) na avaliação histológica. Urdzíkova et al. (2006) demonstraram esse potencial de migração das CTM após aplicação endovenosa, acompanhando a trajetória de migração e a incorporação no tecido medular lesionado de células marcadas com óxido de ferro através de ressonância magnética.

Trinta e cinco dias após o transplante, a presença de células fluorescentes vermelhas permite afirmar que as CTM não só atingiram o tecido alvo, como também se integraram ao tecido nervoso, podendo ter ocorrido diferenciação para células da linhagem neural, pois as CTM são capazes de diferenciar *in vivo* em células da linhagem neural, exibindo marcadores específicos para astrócitos (GFAP - *glial fibrillary acidic protein*) e oligodendrócitos (MBP – *myelin basic protein*) [Cho et al., 2009], embora, no presente trabalho, não tenha sido realizado testes que comprovassem a diferenciação.

CONCLUSÃO

As avaliações realizadas no presente experimento demonstram que a aplicação de CTM promove melhor recuperação da função motora após trauma raquimedular do que o estabelecido com SSMP; o transplante alógeno endovenoso de CTM é capaz de fornecer células que atingem o tecido nervoso lesionado sem promover reação imunológica; as CTM incorporaram-se ao tecido alvo, devido a observação de células marcadas com Q-tracker no tecido nervoso; e, o tratamento com SSMP 3 horas após a lesão não contribuiu positivamente para o processo de recuperação motora e nem na preservação de tecido nervoso.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e FUNADESP (Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular) pelo apoio financeiro. Aos Laboratórios de Imunogenética da Universidade Federal de Minas Gerais, de Histologia do Departamento Biologia Geral e do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV-BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson DK, Means ED, Waters TR. (1982). Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. J. Neurosurg., 56:106-113.

Ankeny DP, McTigue DM, Jakerman LB. (2004). Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. Exp. Neurol., 190:17-31.

Arias, MVB, Severo MS, Tudury EA. (2007). Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. Semina: Ciências Agrárias, 28(1):115-134.

ASIA - Standard neurological classification of spinal cord injury. [American Spinal Injury Association web site]. October, 2006. Disponível em: http://www.asia-spinalinjury.org/publications/2006_Classif_worksheet.pdf. Acessado em: 20 de novembro de 2010.

Bagley RS, Harrington ML, Silver GM, et al. (1999). Exogenous spinal trauma: clinical assessment and initial management. Vet. Neurology, 21:1138-1143.

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

Bergman R, Lanz O, Shell L. (2000). Acute spinal cord trauma: mechanisms and clinical syndromes. Vet. Med., 95:846-849a.

Bergman R, Lanz O, Shell L. (2000). A review of experimental and clinical treatments for acute spinal cord injury. Vet. Med., 95:855-866b.

Blight AR. (2000). New drugs for spinal trauma. Am. Col. Vet. Int. Med. Forum., 18:292-293.

Bracken MB, Holford TR. (1993). Effects os timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. J. Neurosurg., 79:500-507

Braund KG, Shores A, Brawner WR. (1990). The etiology, pathology, and pathophysiology of acute spinal cord trauma. *Vet. Med.*, 85:684-691.

Brown AS, Hall ED. (1992). Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of shock and trauma, with focus on central nervous system injuries. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 200:1849-1858

Carvalho MOP, Barros Filho TEP, Tebet MA. (2008). Effects of methylprednisolone and ganglioside Gm-1 on spinal lesion: a functional analysis. *Clinics*, 63:375-380.

Cho SR, Kim YR, Kang HS, et al. (2009). Functional recovery after the transplantation of neutrally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplant.*, 8:1359-1368.

Chopp M, Zhang, XH, Li Y, et al. (2000). Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *NeuroReport*, 11:3001-3005.

Cízková D, Rosocha J, Vanický I, et al. (2006). Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol. Neurobiol.* 26:1167-1180.

Constantini S, Young W. (1994). The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal Cord injury in rats. *J. Neurosurg.*, 80:97-111.

Cristante AF. Emprego das células progenitoras no tratamento da lesão medular crônica em humanos: análise do potencial evocado somato-sensitivo em 39 pacientes (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

Deng Y, Liu X, Liu Z, et al. (2006). Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytotherapy*, 8:210-214.

Domicini M, Le Blanc K, Mueller I, et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, 8:315-317.

Ducker TB, Zeidman SM. (1994). Spinal cord injury: role of steroid therapy. *Spine*, 19:2281-2287.

Ferrari G, Anderson BL, Stephens RM et al. (1995). Prevention of apoptotic neuronal death by GM-1 ganglioside-involvement of trk neurotrophin receptors. *J. Biol. Chem.*, 270:3074-3080.

Figoni, S. (1993). Exercise response and quadriplegia. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 25:433-441.

Foret A, Quertainmont R, Botman O, Bouhy D, Amabili P, Brook G, Schoenen J, Franzen R (2010). Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise. *J. Neurochem.*, 112:762-772.

Furusawa K, Tajima F, Umezu Y, et al. (2003). Activation of natural killer cell function in recreational athletes with paraplegia during a wheelchair half-marathon race. *Arch. Physiol. Med. Rehabil.*, 84:706-711.

Gebrin AS, Cristante AF, Marcon RM, et al. (1997). Intervenções farmacológicas no trauma raquimedular: uma nova visão terapêutica. *Acta Ortop. Bras.*, 5:123-133a

Gebrin AS, Cunha AS, Silva CF, et al. (1997). Perspectivas de recuperação do lesado medular. *Rev. Bras. Ortop.*, 32:103-108b.

Guzen FP, Guzen PFB, Lemes MB, et al. (2009). Tratamento farmacológico e regeneração do sistema nervoso central em situações traumáticas. *Rev. Neurocienc.*, 17:128-132.

Haghighi SS, Agrawal SK, Surdell DJr, et al. (2000). Effects of methylprednisolone and MK-801 on functional recovery after experimental chronic spinal cord injury. *Spinal Cord*, 38:733-740.

Hall ED. (1992). The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J. Neurosurg.*, 76:13-22.

Hurlbert RJ. (2000). Methylprednisolone for acute spinal Cord injury: na inappropriate stan-dard of care. *J. Neurosurg.*, 93:1-7.

Hurlbert RJ. (2001). The role of steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine*, 26(24 suppl):S39-46.

Jeffery N, Penderis J, Smith PM, et al. (2001). Bridging the divide: spinal cord repair by cellular transplantation-from research laboratory to therapeutic application. *J. Small A. Pract.*, 42:428-432.

Kaptanoglu E, Tuncel M, Palaoglu S, et al. (2000). Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg.*, 93(suppl1):77-84.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:10711-10716.

Krassioukov AV e Weaver LC (1995). Episodic hypertension due to autonomic dysreflexia in acute and chronic spinal cord-injured rats. *Am. J. Physiol.* 268:H2077-H2083.

Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, et al. (2004). BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther.*, 9:189-197.

Lu J, Ashwell KWS, Waite P. (2000). Advances in secondary spinal cord injury: Role of apoptosis. *Spine*, 25:1859-1866.

Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. (2005). BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 191:344-360.

Mahmood A, Lu D, Wang L, et al. (2002). Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 19:1609-1617.

Majumder M, Thiede M, Mosca J. (1998). Phenotype and functional comparison of cultured of marrow derived mesenchymal stem cells and stromal cells. *J. Cell Physiol.*, 176:57-66.

Mallei A, Aden SA, Bachis A, et al. (2005). The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. *Brain Res.*, 1062:16-25.

Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, et al. (2002). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp. Hematol.*, 30:879-886.

Meirelles L da S e Nardi NB (2009). Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci.*, 14:4281-4298.

Merola A, O'Brien MF, Castro BA, et al. (2002). Histologic characterization of acute spinal cord injury treated with intravenous methylprednisolone. *J. Orthop. Trauma*, 16:155-161.

Mezey E, Key S, Vogelsang G, et al. (2003). Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100:1364-1369.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88:471-488.

Nardi NB, Meirelles LS. (2006). Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Exp. Pharmacology*, 174: 249-282.

Nomura T, Honmou O, Harada K, et al. I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience* 2005;136:161-169.

Pittenger MF, et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-147.

Pratt ES, Green DA, Spengler DM. (1990). Herniated intervertebral discs associated with unstable spinal injuries. *Spine*, 15:662-666.

Rabchevsky AG, Fugaccia I, Sullivan PG, et al. (2002). Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal Cord. *J. Neurosci. Res.*, 68:7-18.

Ramsey JBG, Ramer LM, Inskip JA, et al. (2010). Care of rats with complete high-thoracic spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, 27:1709-1722.

Rho GJ, Kumar BM, Balasubramanian SS. (2009). Porcine mesenchymal stem cells – current technological status and future perspective. *Front Biosci.*, 14:3942-3961.

Sanchez-Ramos JR. (2002). Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J. Neurosc. Res.*, 69:880-893.

Sharp J, Frame J, Siegenthaler M, et al. (2010). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after cervical spinal cord injury. *Stem Cells*, 28:152-1562.

Silva CMO, Melo EG, Almeida AERF, et al. (2008). Efeito da prednisona em lesão medular aguda experimental em ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60:641-650.

Tator CH, Fehlings MG. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neuros.*, 75:15-26.

Tebet MA, Barros Filho TEP, Machado IR, et al. (2003). Efeito da metilprednisolona na lesão medular em ratos: análise funcional e histológica. *Acta Ortop. Bras.*, 11:80-87.

Thomas W.B. (2000). Initial assessment of patients with neurologic dysfunction. *Vet. Clin. N. Am. Small A. Pract.*, 30:1-23.

Urdzíkova L, Jendelová P, Glogarová K, et al. (2006). Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma*, 23:1379-1391.

Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, et al. (2001). A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J. Neurotrauma*, 18:1399-1407.

Vialle EM, Vialle LR, Bleggi-Torres LF, et al. (2007). Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos. *Rev. Bras. Ortop.*, 42:101-103.

Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, et al. (2007). Erythropoietin-mediated preservation of the White matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience*, 144:865-877.

Wang L, Li Y, Chen J, et al. (2002). Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp. Hematol.*, 30:831-836.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cell differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.*, 61:364-370.

Young W, Flamm ES. (1982). Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J. Neurosurg.*, 57:667-673.

Young W. Recovery mechanisms in spinal cord injury: implications for regenerative therapy. In: Seil AJ, ed. *Neural Regeneration and Transplantation*. New York, Alan Liss Press, 1995:157-159.

Young W. (1993). Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. *J. Emerg. Med.*, 11(suppl1):13-22.

ARTIGO III

AVALIAÇÃO DO TEMPO PARA INICIO DO TRATAMENTO DE LESÃO MEDULAR COMPRESSIVA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Mesenchymal stem cells therapy in varied time points after spinal cord injury

Avaliação do tempo para início do tratamento de lesão medular compressiva com células-tronco mesenquimais

RESUMO

Células-tronco mesenquimais (CTM) têm demonstrado benefícios terapêuticos na lesão medular, devido a secreção de fatores neurotróficos, estimulação de células do tecido alvo e, substituição de células do tecido neural. O presente trabalho avaliou o uso de CTM alógenas em três diferentes intervalos de aplicação intravenosa após lesão espinal compressiva visando verificar a existência de melhor período para o transplante. CTM obtidas da medula óssea de ratos Wistar, foram cultivadas e submetidas à caracterização fenotípica e diferenciação osteogênica. Foram transplantadas células da quarta à sexta passagem, por via endovenosa nos animais após 3 horas, 3 dias e 7 dias após lesão medular (dplm). A lesão espinal compressiva foi realizada com insuflação de 15µL do *cuff* do cateter de Forgat n.º 2 Fr. no espaço epidural T8 durante 5 minutos. Os animais foram alocados em 4 grupos distintos, de 10 animais em cada. O grupo controle (GC) recebeu 1mL de solução PBS por via endovenosa; o grupo 3 horas (G3h) recebeu administração das CTM três horas pós-lesão; o grupo 3 dias (G3D) recebeu as CTM 3 três dplm; e o grupo 7 dias (G7D) recebeu as CTM 7 dplm. Realizou-se avaliação motora com a escala de Basso-Beattie-Bresnehan (BBB) semanalmente até o 35º dia após a lesão e, avaliação histológica da área da lesão, área total e percentual de tecido nervoso preservado no 35º dia. Células com fluorescência vermelha foram observadas no tecido 35 dias após a lesão nos grupos que receberam o transplante alógeno. Os três grupos tratados com as CTM apresentaram recuperação da função motora significativamente melhor que o grupo controle. O percentual de tecido preservado foi maior nos grupos que receberam o transplante, sendo o G3h o que obteve melhor índice. Conclui-se que administração de CTM alógenas não induz rejeição no modelo avaliado, promove preservação do tecido nervoso e incremento da função motora, sendo o melhor período para aplicação o de três horas após a lesão espinal.

Palavras-chave: Trauma raquimedular, terapia celular, neuroproteção, recuperação motora

Mesenchymal stem cells therapy in varied time points after spinal cord injury

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from different sources in adult organism have demonstrated therapeutic benefits in neurological disorders, especially in spinal cord injury (SCI). Cell therapy with bone marrow-derived cells and MSC from adipose tissue provides improvement of motor function after SCI due to secretion of neurotrophic factors stimulation of target tissue cells and replace neural cells. This study evaluated the use of MSC in three different intervals after SCI. MSCs from rat bone marrow were cultivated and expanded *in vitro* until transplantation. Cells from the fourth passage underwent osteogenic differentiation and immunophenotyping with anti-CD45, anti-CD90, anti-CD73 and anti-CD54. MSCs from fourth to sixth passage were administered intravenously in animals after 3 hours, 3 days and 7 days of SCI. Spinal cord injury was performed with 2-Fr Fogarty catheter after T9-T10 laminectomy. Animals were divided into four groups: control group (CG) who received 1mL of PBS intravenously and group 3 hours (GCT) received administration of MSC three hours after SCI, group 3 days (G3D), which received MSCs three days post-injury, group 7 days (G7D), which MSC received seven days after injury. Motor evaluation was performed with the Basso-Beattie scale-Bresnehan (BBB) weekly until the 35th day after lesion, and histologic evaluation of the lesion area, total area and percentage of preserved tissue on day 35. The cells were observed in 35 tissue days after injury in all groups receiving allogeneic transplants, independent of the range of application in relation to spinal cord injury. The three groups treated with MSC showed recovery of motor function significantly better than the control group. The percentage of tissue preserved groups was higher in the transplanted cells, and the GCT which had the best rate. We conclude that administration of MSC alien until 7 days after spinal cord injury, promoting increased function motor, preserves neural tissue and does not induce transplant rejection.

Keywords: Spinal cord injury, cell therapy, neuroprotection, locomotor function recovering

INTRODUÇÃO

A lesão medular representa um grande desafio terapêutico uma vez que os tratamentos disponíveis, atualmente, não são capazes de promover melhora funcional adequada e, menos ainda, auxiliar na reparação do tecido nervoso (Hulsebosch, 2002; Vialle et al., 2007). Disto, resulta menor qualidade de vida para os pacientes e incremento nos custos hospitalares, especialmente para humanos (Westgren e Levi, 1998; Vialle et al., 2007).

A recuperação da medula espinal após lesão é difícil e pequena, pois o sistema nervoso central (SNC) apresenta habilidade limitada na regeneração de células afetadas, reposição da bainha de mielina e restabelecimento funcional das conexões axonais e neuronais perdidas após o trauma (Akiyama et al., 2002; Ankey et al., 2004; Lee et al., 2007; Del-Bel et al., 2009).

Quatro horas após a lesão espinal, grande número de células neuronais e gliais apoptóticas são observadas, havendo picos de apoptose neuronal com oito horas e glial com 24 horas (Lu et al., 2000). Um aumento progressivo da área lesada e cavitações é observada ao longo do tempo devido a progressão das lesões secundárias (Tator e Fehling, 1991; Agrawal et al., 1996). Sete dias após a lesão, observa-se mais morte neuronal, glial e um pico de apoptose de oligodendrócitos (Li et al., 1996), que perdura por até 3 semanas, agravando a degeneração axonal (Xu et al., 2009). No intervalo de um mês, as áreas de cavitação são bem definidas e o tecido necrótico é substituído por células gliais, sobretudo astrócitos, que irão formar a cicatriz glial (Beattie et al., 1998; Casha et al., 2001; Radojicic et al., 2005). A formação da cicatriz glial é a última etapa da fisiopatologia da lesão espinal, e constitui uma barreira aos esforços regenerativos de axônios e células neurais (Bradbury e Carter, 2011).

A terapia celular constitui uma estratégia promissora na recuperação funcional após lesão medular (Osaka et al., 2010). Células-tronco embrionárias (McDonald et al., 1999), neurais (Ogawa et al., 2002; Okano et al., 2003), precursoras de células da glia (Cao et al., 2005) e CT mesenquimais (CTM) obtidas de tecidos adultos, como a medula óssea (Chopp et al., 2000; Hofstetter et al., 2002; Koshizuda et al., 2004; Urdzíkova et al., 2006; Sazaki et al., 2009; Osaka et al., 2010), cordão umbilical (Dasari et al., 2007; Lim et al., 2007; Cho et al., 2008; Erdogan et al., 2010)

e tecido adiposo (Kang et al., 2007), demonstraram ter efeito na recuperação da função motora em modelos animais, embora não se saiba sobre a real participação destas células (Cho et al., 2009). O maior interesse na utilização de CTM para o tratamento de afecções do sistema nervoso surgiu com a evidência que estas células são capazes de diferenciar-se em linhagens celulares neurais *in vitro* e *in vivo* (Woodbury et al., 2000; Deng et al., 2001; Kim et al., 2006; Cho et al., 2009), contudo seu efeito parácrino parece ser a principal contribuição em lesões do SNC (Cho et al., 2009).

Os benefícios do transplante de CTM existem e já foram comprovados, contudo, não está estabelecido se existe, e qual o melhor momento de aplicação destas células, frente aos eventos progressivos que ocorrem no tecido espinal, incluindo isquemia, fluxos iônicos, produção de radicais livres e peroxidação lipídica, resultando em morte celular e aumento da área de lesão (Tator e Fehling, 1991).

No presente estudo, CTM foram transplantadas por via endovenosa, em diferentes intervalos de tempo, após lesão medular compressiva em ratos Wistars, objetivando avaliar a existência de melhor período para obtenção da recuperação motora e atenuação dos danos teciduais à medula espinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Utilizou-se cinco ratos Wistars, de 4 semanas de vida, para a realização do estudo *in vitro*: coleta, cultivo e caracterização das CTM; e 40 ratos Wistar machos, pesando entre 250 a 300g, para o estudo *in vivo*, todos oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais do estudo *in vivo* foram alojados em caixas com cinco animais, sob condições de umidade e temperatura controladas, fotoperíodo de 12 horas e receberam água e ração comercial *ad libitum* durante todo o período experimental.

O trabalho foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa sob parecer n.º 2/2010.

Cultivo e preparação das células para transplante

As medulas ósseas dos cinco ratos foram coletadas dos fêmores e cultivadas com meio DMEM completo (meio base Dulbecco's Modified Eagle's Medium, baixa glicose, 3,7g/L de bicarbonato de sódio e 10-15mM HEPES-acid-free com adição de 20% de soro fetal bovino) em estufa à 37°C com 5% de CO₂ até obtenção da sexta passagem. As culturas foram monitoradas, diariamente, com auxílio de microscópio óptico invertido de contraste de fase e o meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias.

Para o transplante, foram utilizadas doses a partir das culturas da quarta à sexta passagem, na concentração de 1×10^7 células/mL de PBS por animal. As células foram previamente incubadas por 60 minutos, a 37°C, com o Qtracker Cell Labeling 655® (Invitrogen, California, EUA), segundo recomendações do fabricante.

As células marcadas foram tripsinizadas e centrifugadas para a obtenção do *pellet* celular. O *pellet* foi ressuspensionado em PBS e alíquotas de 1×10^7 células foram preparadas em 1,0mL de PBS, centrifugadas e armazenada em caixa de isolamento térmico até o momento da aplicação endovenosa.

Duas doses extras foram preparadas para avaliação à fresco em microscópio de fluorescência e para inclusão do *pellet* celular em resina acrílica (HistoResin® Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) para comprovar a eficácia da nanomarcagem. Nas amostras processadas, histologicamente, as lâminas foram contracoradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, CA, USA) para a identificação do núcleo e avaliadas por microscopia de fluorescência.

Células na quarta passagem foram submetidas aos testes de diferenciação osteogênica em meio DMEN enriquecido com 10% de SFB, 10^{-8} mol/mL de dexametasona, 5,0µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato, 10,0mmol/L de β-glicerofosfato. No 30º dias após início da diferenciação, as culturas foram fixadas em paraformaldeído e coradas com Vermelho de Alizarina e Von Kossa para identificar deposição de cálcio.

Na imunofenotipagem, as amostras de células da quarta passagem foram incubadas com os anticorpos primários anti-CD45 clone 69 mouse, anti-CD90 clone Ox-7 mouse, anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse e anti-CD54 clone 1A29 mouse (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), por 30 minutos, à 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com

fluorocromo Alexa 488 sob as mesmas condições anteriores. As amostras foram analisadas usando citômetro de fluxo FACSscan e software CellQuest®.

Lesão medular

Os animais receberam analgesia pré-empitiva com fentanil (0,3mg/Kg/IM), foram sedados com Diazepan (2,5mg/Kg/IP) e anestesiados com Isoflurano em circuito anestésico com oxigênio 100%. Foi realizada antimicrobianoprofilaxia com enrofloxacin (10mg/Kg) por via intramuscular.

Após a tricotomia ampla do dorso e da antisepsia da pele com solução de Povidine®, foi realizada incisão de 5cm na linha média dorsal, tendo como referência os processos espinhosos da oitava vértebra torácica (T8) à primeira vértebra lombar (L1). O tecido subcutâneo foi incisado, seguido do afastamento subperiosteal da musculatura paravertebral, com uso de lâmina de bisturi n.º 11.

A nona e a décima vértebras torácicas (T9 e T10) foram identificadas por meio da contagem dos arcos costais e, sob magnificação com microscópio cirúrgico, foi realizada laminectomia da vértebra torácica nove (T9) e dez (T10) com broca trefina de 4mm de diâmetro em perfuratriz elétrica. A duramater foi mantida íntegra e a medula espinal foi exposta e avaliada sob magnificação para comprovar integridade após a remoção do arco dorsal.

Para promover a lesão espinal compressiva, um cateter de Forgaty n. 2 Fr foi introduzido no espaço epidural e conduzido, cranialmente, até o segmento medular T8-T9. O *cuff* do cateter foi insuflado com 15µL de solução salina e mantido desta forma por cinco minutos, realizando a compressão da medula.

O cateter foi removido após esvaziamento do *cuff* seguindo-se a aproximação da musculatura e tecido subcutâneo em planos anatômicos com fio vicril 4-0, em padrão simples contínuo e dermorrafia com mononáilon 3-0, em padrão colchoeiro.

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

Após a cirurgia, os animais foram alojados em trios para reduzir o estresse de isolamento e receberam analgesia com morfina (5mg/Kg/SC), a cada 4 horas, por 3 dias. Os animais permaneceram no biotério sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo anteriores ao procedimento cirúrgico.

Grupos e tratamentos

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos de 10 animais e receberam tratamentos distintos após a indução da lesão:

- Grupo Controle (GC): 1mL de solução PBS, por via endovenosa, três horas após a lesão;
- Grupo CTM 3 horas (G3h): 1×10^7 células/mL, por via endovenosa, três horas após a indução da lesão espinal;
- Grupo CTM 3 dias (G3D): 1×10^7 células/mL, por via endovenosa, três dias após a indução da lesão espinal;
- Grupo CTM 7 dias (G7D): 1×10^7 células/mL, por via endovenosa, sete dias após a indução da lesão espinal.

As doses contendo 1×10^7 células/mL de PBS foram ressuspensas no momento de aplicação e injetadas, na veia lateral da cauda ou safena lateral, no momento correspondente aos preconizados para cada grupo. Mesmo acesso foi utilizado para aplicação do PBS no GC.

Todos os animais foram acompanhados, diariamente, por 35 dias após a lesão medular compressiva (dplm). Neste período foi realizada a avaliação da função motora semanalmente. Ao 35º dia, foi coletada a medula espinal para avaliação histológica.

Avaliação da Função Motora

A avaliação da função motora foi realizada anteriormente à indução da lesão espinal, 24 horas pós-lesão e, semanalmente, até o 35º dia pós-lesão, utilizando-se a escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB).

Dois avaliadores observaram os movimentos das articulações coxofemoral, fêmoro-tíbio-patelar, tíbio-társica, a posição do tronco, cauda e dos membros pélvicos durante a caminhada dos animais em campo aberto e, classificaram os animais no escore de zero a 21, segundo Basso et al. (1995), sendo zero o correspondente à ausência total de movimentos e 21 à presença de movimentos normais dos membros pélvicos.

Após a lesão medular, pressão manual da bexiga foi realizada oito vezes ao dia até o restabelecimento do reflexo de esvaziamento da bexiga. Os ratos foram

monitorados quanto à evidência de hematúria, infecção do trato urinário ou outros sinais de doença sistêmica.

Avaliação Histológica da Área da Lesão

No 35º dia pós-lesão (dplm), após a eutanásia dos animais em câmara anestésica com isoflurano, foram realizadas infusões intracardíacas de solução fisiológica (NaCl 0,9%) heparinizada, seguida de solução de Karnovisk (paraformaldeído 4% em tampão fosfato, pH 7,4 e glutaraldeído 2,5%). Posteriormente, a medula foi cuidadosamente removida do canal espinal e um fragmento de 5 cm de comprimento, contendo a lesão macroscópica ao centro, foi mantido em solução de Karnovisk a 4°C por 24 horas. Transcorrido esse período, o material foi acondicionado em álcool 70° e processado para avaliação histológica.

Em cada grupo, dez amostras de medula foram coletadas, das quais oito foram incluídas em paraplast e cortadas com espessura de 5µm transversalmente ao plano sagital mediano, em duplicata, para coloração de Hematoxilina-Eosina; e duas amostras incluídas em resina acrílica e cortadas, transversalmente, com espessura de 3µm para avaliação em microscopia de fluorescência, objetivando verificar a presença de fluorescência das células transplantadas.

Previamente à inclusão, as dez amostras de cada grupo foram seccionadas em três fragmentos: porção cranial à lesão macroscópica, porção da lesão e porção caudal à lesão macroscópica. O fragmento da lesão foi dividido em dois a partir do epicentro da lesão.

As lâminas foram avaliadas e fotografadas em microscópio ótico Nikon Eclipse 80i (Nikon *Instruments Co.*, Melville, EUA) para posterior análise no software Image-Pro Plus 4.5 (*Media Cybernetics*, Bethesda, EUA).

As imagens para análise foram obtidas nas secções transversais da medula espinal, sendo que para cada animal obteve-se: 12 secções da porção cranial; 24 da lesão; e 12 da porção caudal, todas com intervalo de 50µm entre os cortes.

Foi realizado estudo morfométrico com obtenção de dados da área total (área seccional externa total da medula), área lesionada (contida dentro da total, composta por formação cística, cavitação, gliose, edema axonal e perda da organização tecidual) e percentual de tecido preservado (relação da área preservada sobre a total) em cada lâmina.

As lâminas foram adicionalmente avaliadas em microscópio fluorescente Nikon Eclipse 80i para identificação de fluorescência vermelha no comprimento de onda 655, indicativo da presença das células transplantadas com o nanocristal fluorescente (Qtracker 655®).

Análise estatística

Os valores numéricos da avaliação neurológica da recuperação da função motora através do teste BBB nos momentos 1º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dias pós-lesão, em cada um dos grupos (GC, GM e GCT), foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors e de homogeneidade de variâncias de Cochran e Bartlett.

Foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn caso houvesse diferença significativa entre os grupos ou dentro de um mesmo grupo.

Os valores de área total, área de lesão e percentual de área preservada foram avaliados pelos mesmos testes anteriores.

Foi adotado o nível de significância de 0,05 ($\alpha=5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes e representados por asterisco (*).

RESULTADOS

Caracterização das CTM derivadas da medula óssea

As células provenientes da medula óssea de ratos Wistar cresceram em monocamada e assumiram morfologia fibroblastóide (figura 1A). Foi observada mudança da morfologia celular e calcificação da matriz extracelular nas amostras cultivadas em meio de diferenciação osteogênico (figura 1B).

Utilizando análise por citometria de fluxo, as CTM indiferenciadas da quarta passagem demonstraram expressão negativa para o marcador de superfície CD45 (83,09%) e positiva para os marcadores CD54 (93,83%), CD73 (70,44%) e CD90 (98,82%) [figura 2].

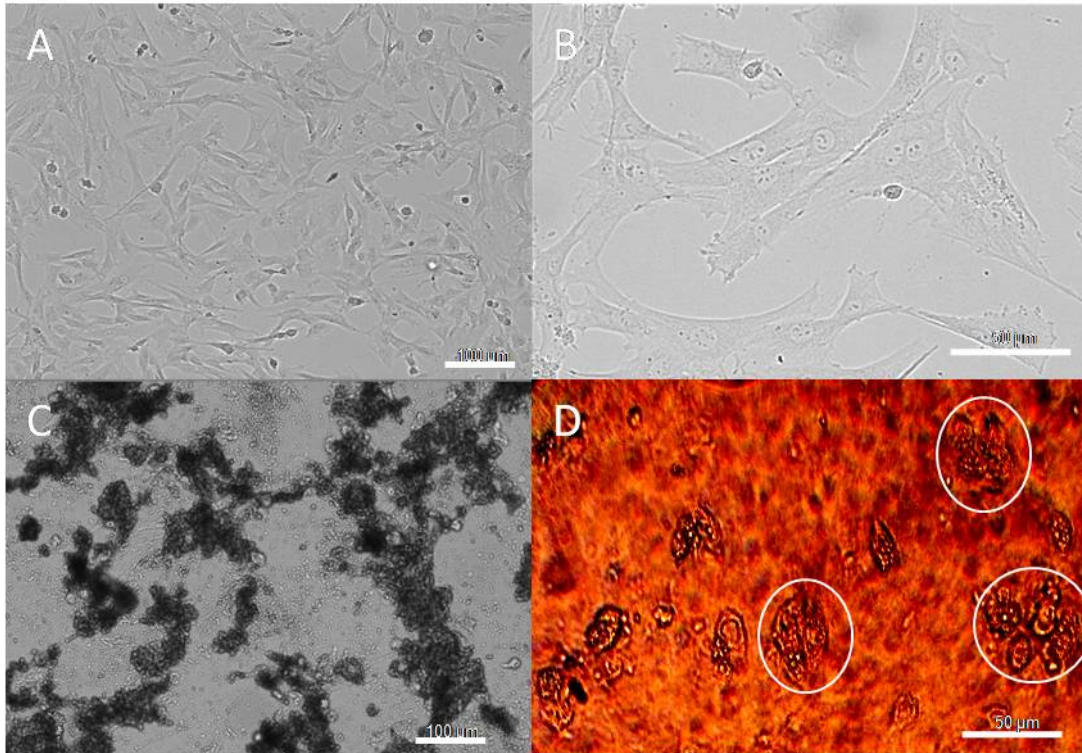


Figura 1. Morfologia das CTM *in vitro*. CTM indiferenciadas, com distribuição homogênea e morfologia fibroblastóide (A e B). CTM sob diferenciação osteogênica, exibindo calcificação da matriz extracelular (C) e ninhos de células arredondadas (círculos) semelhantes a osteoblastos (D).

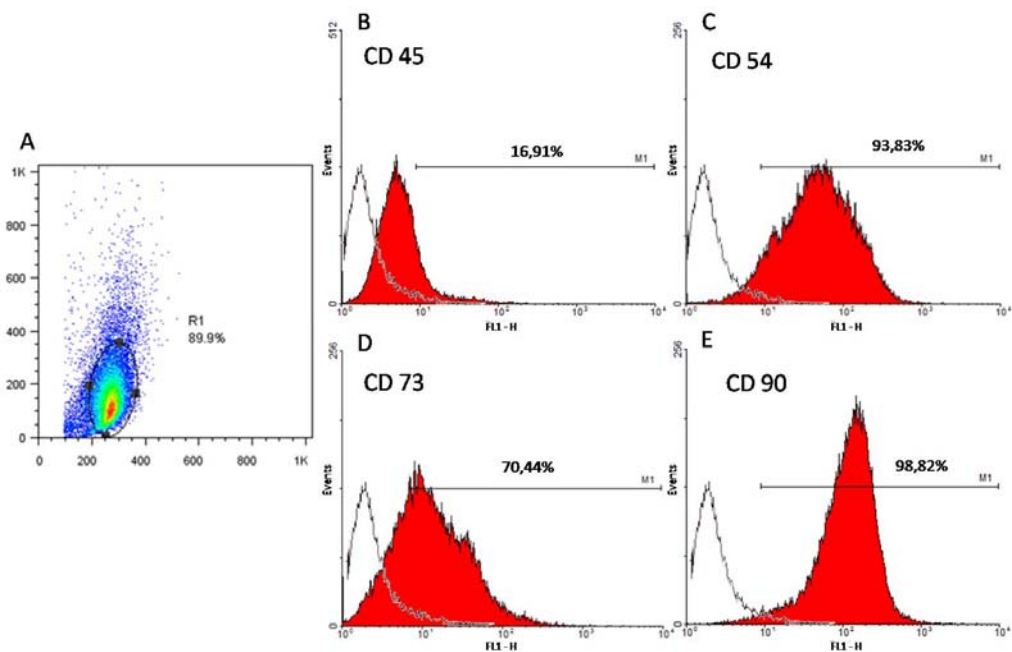


Figura 2. Caracterização das CTM de ratos Wistar por citometria de fluxo. População escolhida para análise (A). A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos vermelhos) esta comparada com os isotipos controle (gráficos abertos) e representada em valores percentuais (B, C, D e E).

Nanomarcacão das CTM para transplante

As células marcadas com o Q-tracker 655 apresentaram fluorescência citoplasmática (cor vermelha) no momento anterior ao transplante, tanto nas amostras à fresco (figura 3A) quanto no *pellet* processado histologicamente (figura 3B), comprovando que as células utilizadas para o transplante foram adequadamente marcadas para posterior pesquisa no tecido medular.

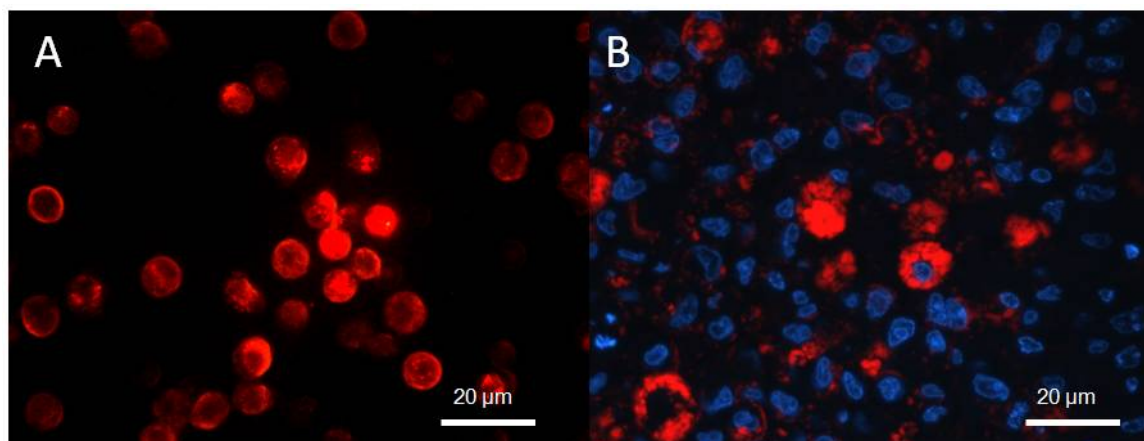


Figura 3. Fotomicrografia das CTM após nanomarcacão com Q-tracker®. A) demonstra as células em suspensão de uma dose de 1×10^7 cel/mL exibindo fluorescência vermelha. B) Células contendo os cristais fluorescentes vermelho após processamento histológico em resina. Os núcleos foram contra corados com DAPI.

Avaliação da Função Motora

A apresentação neurológica dos animais foi compatível com lesão medular grau B da escala da *American Spinal Injury Association* (ASIA), que indica lesão incompleta da medula com sensibilidade preservada, mas nenhuma função motora abaixo do nível da lesão neurológica.

Os resultados da avaliação da função locomotora, segundo a escala de BBB, dos ratos no 1º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dia pós-lesão medular distribuídos em cada grupo estão apresentados em média e desvio padrão na tabela 1, demonstrando que os três tratamentos com as CTM apresentaram diferença estatística com o grupo controle, mas não diferiram entre si.

A evolução da recuperação motora, nos diferentes grupos, está ilustrada na figura 4. Todos os animais, independente do grupo, apresentaram melhora funcional ao término dos 35 dias. No entanto, os grupos tratados com CTM (G3h, G3D e G7D) apresentaram melhor recuperação, atingindo valores superiores ao controle segundo a escala BBB.

Tabela 1. Distribuição da média e desvio padrão da avaliação funcional de BBB no 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dias pós-lesão medular (dplm) em cada grupo.

Grupo	7º dplm	14º dplm	21º dplm	28º dplm	35º dplm
GC	0,90 $\pm$ 1,19 b ¹	3,00 $\pm$ 2,05 b	4,20 $\pm$ 1,98 b ¹	5,20 $\pm$ 1,61 b ^{1,2,3}	6,30 $\pm$ 1,76 b ^{1,2}
G3h	2,20 $\pm$ 0,78 a ¹	4,90 $\pm$ 1,19 ab	6,60 $\pm$ 0,84 a	9,10 $\pm$ 1,72 a ²	12,00 $\pm$ 2,21 a ¹
G3D	1,60 $\pm$ 0,51 ab	5,40 $\pm$ 1,26 a	7,20 $\pm$ 1,03 a ¹	9,40 $\pm$ 2,17 a ¹	11,50 $\pm$ 2,67 a ²
G7D	1,10 $\pm$ 0,87 ab	4,30 $\pm$ 2,00 ab	6,60 $\pm$ 1,89 ab	8,40 $\pm$ 2,01 a ³	10,1 $\pm$ 2,46 a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Números sobrescritos iguais indicam $p < 0,01$ na coluna.

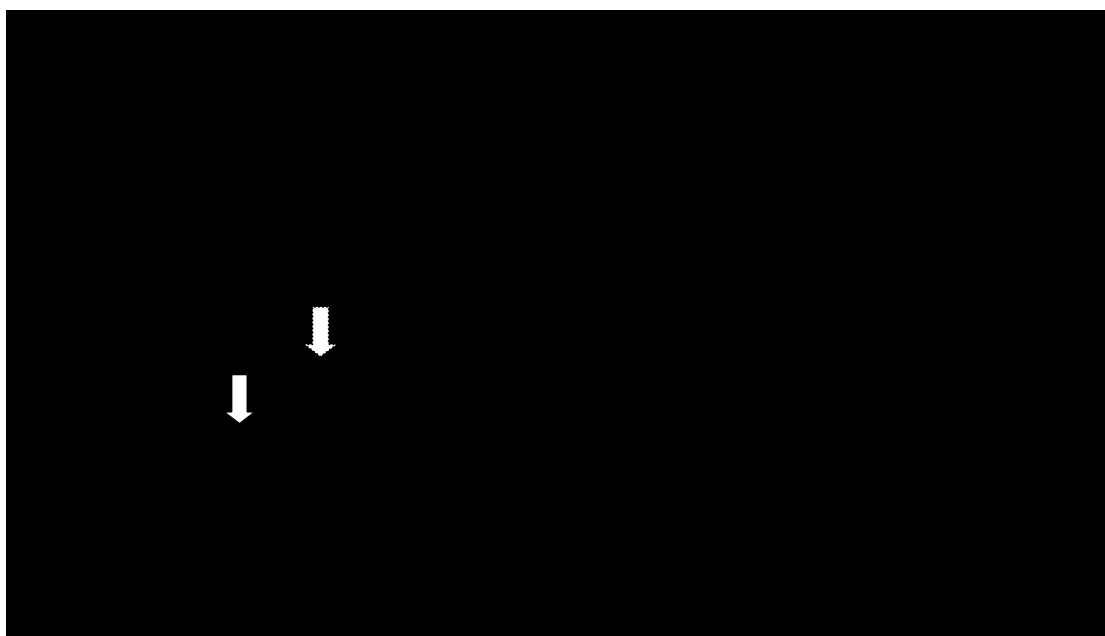


Figura 4. Avaliação locomotora após lesão medular utilizando a escala de BBB ao longo de 35 dias de análise. As setas indicam os momentos de transplante nos grupos G3h (seta preta), G3D (seta branca) e G7D (seta pontilhada).

No sétimo dia de avaliação, o grupo G3h demonstrou melhora da função locomotora superior ao grupo controle ($p < 0,01$) e aos demais grupos tratados com CTM (G3D e G7D).

O grupo G3D apresentou melhora da função motora estatisticamente significativa no 14º dplm quando comparado com o grupo GC. Neste momento de avaliação transcorreram 12 dias após o transplante celular. Neste grupo, a partir do décimo quarto dia, todos os valores de escore BBB diferiram do grupo controle.

Os resultados da avaliação motora, obtidos no grupo G7D, só diferenciaram estatisticamente do grupo GC no 28º dplm, exatos 21 dias após o transplante celular.

No período final de avaliação (35 dplm), todos os grupos tratados com as CTM apresentaram melhores médias de recuperação da função motora do que o grupo controle, as quais foram estatisticamente diferentes. No entanto, estes grupos não apresentaram diferenças entre si, demonstrando que as células apresentam efeito semelhantes mesmo se transplantadas até 7 dplm.

Todos os animais apresentaram arreflexia da musculatura detrusora da bexiga e espasticidade do músculo esfíncter uretral externo, necessitando de massagem vesical suave para induzir a micção. A massagem foi necessária por duas semanas pós-lesão, independente do grupo de tratamento e, posteriormente a este período, os animais retornaram a urinar voluntariamente, mesmo apresentando distensão moderada da bexiga.

Nas primeiras 24 horas pós-lesão, todos os animais apresentaram hematúria, que perdurou em 85% dos animais por 48 horas, sem, no entanto, haver diferença estatística entre os grupos.

Avaliação histológica

Na avaliação das lâminas incluídas em historesina, sob microscopia de fluorescência, observou-se a presença de células exibindo fluorescência vermelha no citoplasma, tanto na área da lesão quanto na sua periferia, em todos os três grupos que receberam o transplante (figura 5).

Na avaliação do percentual de área preservada (figura 6), observou-se que os grupos tratados com as CTM apresentaram valores significativamente maiores que o grupo controle no fragmento cranial (tabela 2).

O grupo GCT apresentou maior percentual de tecido preservado também no fragmento da lesão, sendo nesta avaliação o tratamento que melhor promoveu proteção do tecido nervoso medular.

Não foi observada diferença entre os grupo na avaliação do fragmento caudal quanto ao percentual de área preservada.

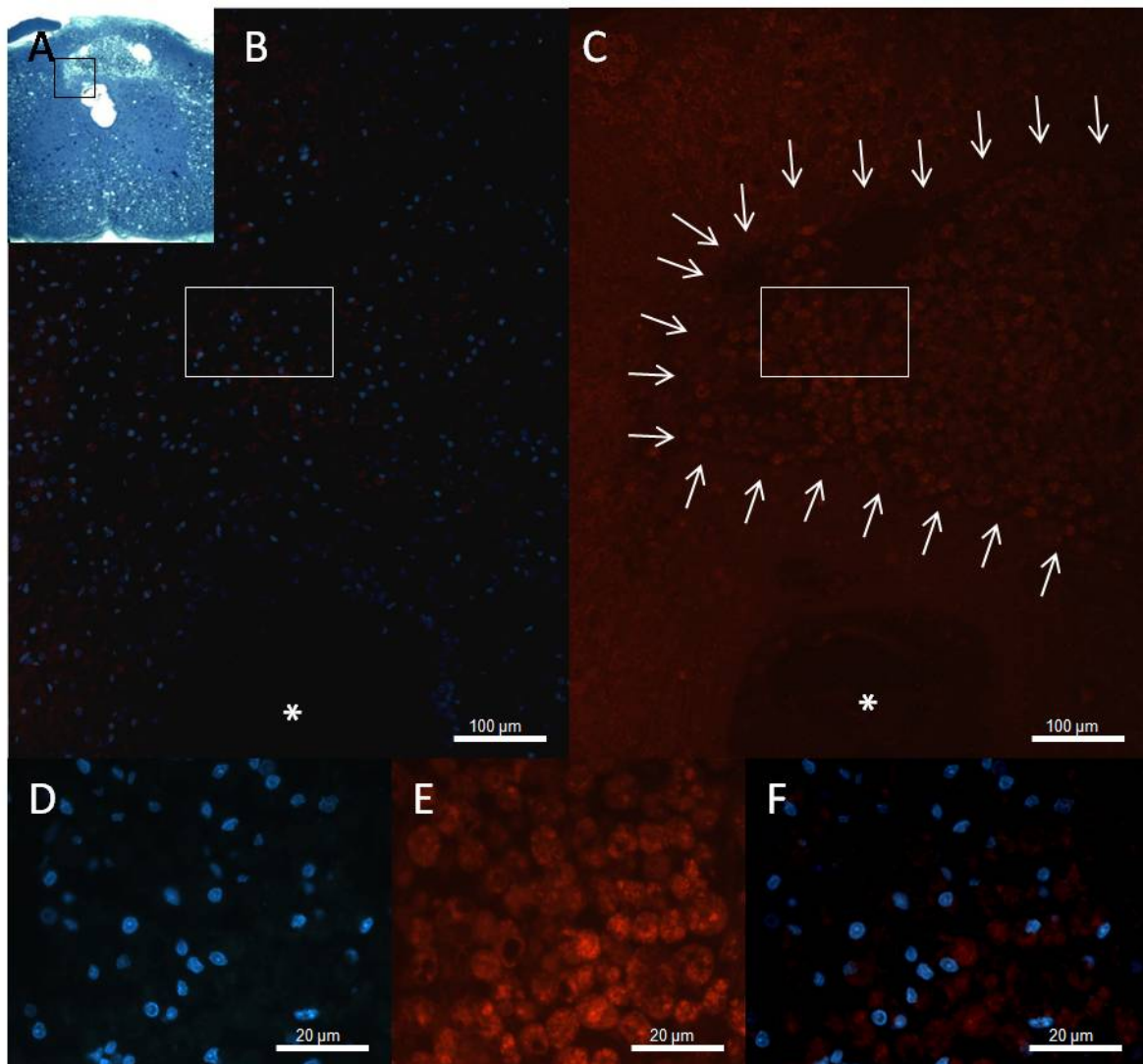


Figura 5. Fotomicrografias do tecido medular sob fluorescência. (A) demonstra a área da periferia da lesão avaliada no fragmento cranial corado em azul de toluidina. (B) demonstra a fluorescência azul pelo DAPI, visualizando todos os núcleos de células no fragmento avaliado. (C) demonstra a fluorescência vermelha das células contendo o Q-tracker na lesão (setas). (D) Ampliação do quadro da imagem B mostrando, em maior detalhe, que todas as células presentes no tecido foram coradas com DAPI. (E) Ampliação do quadro da imagem C mostrando a presença de cristais fluorescentes vermelho no interior de algumas células presentes na área de lesão. (F) Imagem montada por sobreposição de D e E, evidenciando a presença de células com fluorescência na área avaliada. * indica o canal ependimário.

A área de lesão no fragmento cranial foi significativamente menor em todos os grupos tratados com as CTM (figura 6) quando comparados com o grupo controle. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as CTM.

Tabela 2. Valores percentuais de área preservada nos fragmentos cranial, lesão e caudal nos diferentes grupos avaliados.

Grupo	Cranial	Lesão		Caudal
		Lesão I	Lesão II	
GC	85,21±6,63 b ^{1,2,3}	38,32±16,47 a	27,88±20,17 b ³	97,61±2,16 a
GCT	95,49±5,38 a ³	42,63±14,50 b	44,95±14,82 a ^{1,2,3}	96,29±1,48 a
G3D	96,92±3,37 a ²	38,95±29,18 a	34,21±21,44 b ¹	95,56±5,89 a
G7D	97,88±2,95 a ¹	35,45±23,02 a	29,58±16,45 b ²	96,16±3,38 a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Números sobrescritos iguais indicam $p < 0,01$ na coluna.

Na análise microscópica da área de lesão do fragmento contendo a lesão macroscópica, o grupo G3h apresentou a menor área de lesão, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos tratados com as CTM e com o grupo controle. Não foi observada diferença entre os grupos G3D, G7D e GC na área de lesão macroscópica.

O fragmento caudal do grupo controle apresentou o menor valor de área da lesão, sendo estatisticamente diferente de todos os demais grupos tratados com as CTM, os quais não apresentaram diferenças significativas entre si.

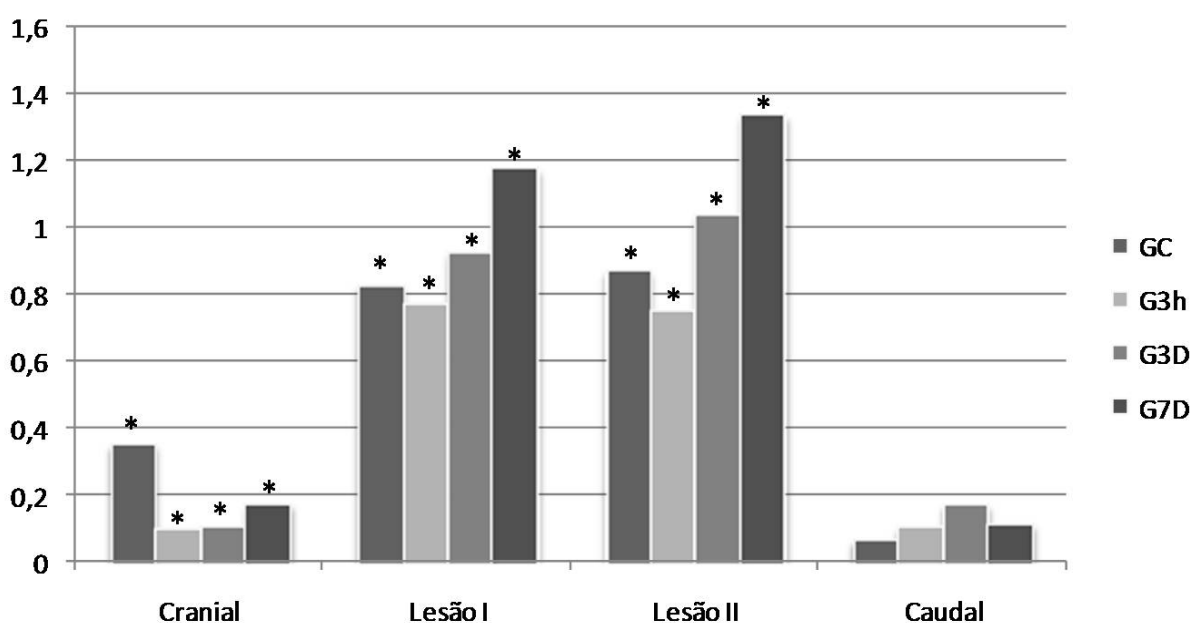


Figura 6. Área de tecido lesado em mm² nos diferentes fragmentos de cada grupo. (* indica $p < 0,01$ entre grupos em um mesmo fragmento e em relação ao controle).

DISCUSSÃO

As células utilizadas no presente trabalho estão de acordo com o preconizado pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) [Dominici et al., 2006], apresentando aderência a placa de cultura, morfologia fibroblastóide, capacidade de diferenciação e padrão de expressão imunofenotípica, o que permite classificar as células utilizadas para os transplantes como células-tronco mesenquimais (CTM) [Pittenger et al., 1999; Dominici et al., 2006; Meirelles e Nardi, 2009].

Todos os animais utilizados no estudo apresentaram paraplegia no pós-cirúrgico imediato e no primeiro dia pós-lesão. A sensibilidade profunda permaneceu em todos os animais, o que indica lesão moderada, grau B da ASIA (ASIA, 2006) e com potencial de reversão, pois a perda da dor profunda resulta em prognóstico desfavorável devido lesão grave e, geralmente, irreversível (Berman et al., 2000a; Berman et al., 2000b).

A presença de hematúria pode ser sinal de infecção do trato urinário (Ramsey et al., 2010), contudo o quadro restrito às primeiras 48-72 horas após a lesão espinal, sem intervenção terapêutica, corresponde à distensão exagerada da bexiga com lesão vascular local, gerando o hematúria aguda e transitória (Santos-Benito et al., 2006).

O grupo controle apresentou menor recuperação da função motora, pois não houve medidas para impedir a progressão das lesões secundárias ao trauma raquimedular, que geram aumento do dano tecidual e diminui a possibilidade de recuperação (Lu et al., 2000, Vialle et al., 2007). Embora o mesmo fosse esperado para os grupos G3D e G7D, evidencia-se que, mesmo após um estabelecimento tardio do transplante celular, as CTM podem auxiliar na recuperação da função motora.

A melhora observada nos grupos G3D e G7D, embora mais lenta do que o grupo G3h, pode ter ocorrido pela substituição de células neuronais perdidas ou em degeneração, ativação de mecanismos compensatórios do próprio tecido, estimulação de células-tronco endógenas do tecido alvo (Chopp et al., 2000), secreção de fatores neuroprotetores e citocinas anti-inflamatórias (Cho et al., 2009), o que não ocorreu no grupo controle, justificando a menor recuperação da função motora.

Segundo Cho et al. (2009), a recuperação da função motora precoce e significativamente melhor em grupos tratados com CTM, aliados à pequena quantidade de células diferenciadas no tecido lesado, indicam que a ação parácrina é a principal contribuição desta modalidade terapêutica. Kurozumi et al., (2004), Lu et al., (2005) e Nomura et al., (2005), provaram que CTM são capazes de secretar fatores de crescimento e citocinas, como o *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *vascular endothelial cell growth factor* (VEGF), além de estimular as células da glia a produzir fatores neurotróficos como NGF e BDNF, o que impede a progressão do dano tecidual devido as lesões secundárias, minimizando o tamanho da lesão e promovendo melhor recuperação da função motora (Majunder et al., 1998; Mahmood et al., 2002; Wang et al., 2002).

A área nos fragmentos da lesão macroscópica não apresentou diferença entre os grupos tratados com as CTM, 3 e 7 dias após a lesão medular, pois assim como no grupo controle, uma vez ocorrida a lesão medular primária, não há tratamento que restaure o tecido nervoso necrótico ou substitua a cicatriz glial formada. Ankeny et al. (2004) e Urdzíkova et al. (2006) também não encontraram diferenças de área total de lesão entre grupos tratados com CTM e tratados com solução salina, mas observaram melhora funcional nos grupos transplantados com CTM.

O grupo G3h, transplantado 3 horas após o trauma medular apresentou diferença na área de lesão nos fragmentos craniais e de lesão, o que sugere que as CTM tenham controlado a evolução das lesões secundárias ao trauma, devido à ação neuroprotetora (Majunder et al., 1998; Mahmood et al., 2002; Wang et al., 2002; Urdzíkova et al., 2006), o que resulta em menor área de lesão, maior porção de tecido íntegro e melhora precoce da função motora. Os demais grupos que receberam o transplante não apresentaram esta diferença em relação ao controle, pois as CTM foram aplicadas dias após a lesão medular, não podendo contribuir na preservação do tecido logo após a lesão medular.

Ao avaliar o percentual de área preservada, observou-se que todos os tratamentos com CTM apresentaram melhores índices de tecido íntegro quando comparados ao grupo controle no fragmento cranial e que somente o grupo que recebeu o transplante 3 horas após o trauma manteve maior porção de tecido íntegro na área da lesão macroscópica, caracterizando ação neuroprotetora das CTM.

Quanto a análise do tecido íntegro no fragmento da lesão, os grupos G3D e G7D não apresentaram diferenças com o grupo controle, pois o tratamento foi instituído dias após o trauma, não impedindo o aumento do dano tecidual. Urdžíková et al (2006) demonstraram que o tratamento com CTM promove maior preservação da substância branca quando comparado com grupo controle, o que explica a melhora da função motora observada nos grupos G3D e G7D.

Embora apenas o grupo G3h tenha demonstrado diferença estatística de maior preservação do tecido nervoso, todos os grupos tratados com as CTM contribuíram positivamente na recuperação da função motora, o que sugere que esse modalidade terapêutica instituída até 7 dias após lesão compressiva da medula espinal promove melhora motora funcional. O benefício da aplicação em período tardio, como o de 7 dias após a lesão, deve-se a proteção de células mielinizantes (oligodendrócitos), que permiti a remielinização dos axônios afetados e melhor recuperação da função motora (Osaka et al., 2010). A secreção de fatores neurotróficos, sobretudo o BDNF, ocorre de forma contínua pelas CTM, promovendo a redução da perda tecidual (Rodrigues et al., 2009; Osaka et al., 2010). Adicionalmente, pode ocorrer nos grupos tratados tardiamente (G3D e G7D) substituição de células neurais, pois as CTM são capazes de diferenciar, *in vivo*, em astrócitos (Cho et al., 2009; Osaka et al., 2010) oligodendrócitos (Cho et al., 2009) e neurônios após lesão medular (Osaka et al., 2010), embora Cho et al. (2009) tenham demonstrado que poucas células transplantadas se diferenciam *in vivo* e que não há uma diferenciação em proporções iguais em todos os tipos de células neurais.

A presença de células fluorescentes na avaliação *in vivo*, confirma que as células transplantadas por via endovenosa são capazes de atingir áreas de lesão na medula espinal e se incorporar ao tecido nervoso, permanecendo por até 35 dias após o transplante. Estudos com ressonância magnética já demonstraram que CTM migram após aplicação endovenosa até a lesão da medula espinal (Jendelová et al., 2004; Urdžíková et al., 2006).

A presença das células fluorescentes após 35 dias da lesão também indica ausência de resposta imune ao transplante alógeno de CTM da medula óssea, visto que diferente de Urdžíkova et al. (2006), Cho et al. (2009) e Osaka et al. (2010), não administrou-se nenhum fármaco imunossupressor. Além da facilidade de obtenção em tecidos adultos e da rápida expansão em cultura, outra vantagem das CTM são

suas propriedades imunes privilegiadas, tornando desnecessário o uso de imunossupressores (Pittenger et al., 1999; Krampera et al., 2003; Le Blanc et al., 2003a; Le Blanc et al., 2003b; Tse et al., 2003; Maitra et al., 2004).

CONCLUSÃO

Nas condições em que o experimento foi realizado, constata-se que o tratamento com CTM promove recuperação precoce e melhor da função motora, sobretudo quando transplantadas 3 horas após a lesão. Adicionalmente evidencia-se que, mesmo após transcorridos sete dias da lesão medular inicial, a terapia celular promove incremento da função motora; e o transplante alógeno endovenoso de CTM é capaz de fornecer células que atingem o tecido nervoso lesionado sem promover reação imunológica.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e FUNADESP (Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular) pelo apoio financeiro. Aos Laboratórios de Imunogenética da Universidade Federal de Minas Gerais, de Histologia do Departamento de Biologia Geral e ao Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV-BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal SK e Fehlings MG. (1996). Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase, the Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger, and the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. J. Neurosci., 16:545–552.

Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, et al. (2002). Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. Glia, 39:229-236.

Ankeny DP, McTigue DM, Jakerman LB. (2004). Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.*, 190:17-31.

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

Beattie MS, Shuman SL, Bresnahan JC. (1998). Review: apoptosis and spinal cord injury. *The Neuroscientist*, 4(3):163-171.

Berman R, Lanz O, Shell L. (2000b). A review of experimental and clinical treatments for acute spinal cord injury. *Vet. Med.*, 95:855-866.

Berman R, Lanz O, Shell L. (2000a). Acute spinal cord trauma: mechanisms and clinical syndromes. *Vet. Med.*, 95:846-849.

Bradbury EJ e Carter LM. (2011). Manipulating the glia scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain Research Bulletin*, 84(4-5):306-316.

Cao Q, Xu XM, Devries WH, et al. (2005). Functional recovery in traumatic spinal cord injury after transplantation of multilineurotrophin-expressing glial-restricted precursor cells. *J. Neurosci.*, 25:6947-6957.

Casha S, Yu WR, Fehlings MG. (2001). Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, 103(1):203-218.

Cho SR, Kim YR, Kang HS, et al. (2009). Functional recovery after the transplantation of neutrally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model os spinal cord injury. *Cell Transplant.*, 18:1359-1368.

Cho SR, Yang MS, Yim SH, et al. (2008). Neurally induced umbilical cord blood cells modestly repair injured spinal cords. *NeuroReport.*, 19:1259-1263.

Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. (2000). Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *NeuroReport.*, 11:3001-3005.

Dasari V, Spomar DG, Gondi CS, et al. (2007). Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, 24:391-410.

Del-Bel EA, Silva CA, Mladinic M. (2009). O trauma raquimedular. *Columna*, 8:441-449.

Deng WW, Obrocka M, Fischer I, et al. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282:148-152.

Domicini M, Le Blanc K, Mueller I, et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, 8:315-317.

Erdogan B, Bavbek M, Sahin IF, et al. (2010). Fetal allogeneic umbilical cord cell transplantation improves motor function in spinal cord-injured rats. *Turkish Neurosurgery*, 20:286-294.

Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:2199-2204.

Hulsebosch CE. (2002). Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv. Physiol. Educ.*, 26:238-255.

Jendelová P, Herynek V, Urdzíkova L, et al. (2004). Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res.*, 76:232-243.

Kang SK, Yeo JE, Kang KS, et al. (2007). Cytoplasmic extracts from adipose tissue stromal cells alleviates secondary damage by modulating apoptosis and promotes functional recovery following spinal cord injury. *Brain Pathol.*, 17:263-275.

Kim S, Honmou O, Kato K, et al. (2006). Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain Res.* 1123:27-33.

Koshizuda S, Okada S, Okawa A, et al. (2004). Transplanted hematopoietic stems from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 63:64-72.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101:3722-3729.

Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, et al. (2004). BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther.*, 9:189-197.

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. (2003b). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.*, 31:890-896.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. (2003a). Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.*, 57:11-20.

Lee K, Kim H, Choi J, et al. (2007). Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 67:13-22.

Li GL, Brodin G, Farooque M, et al. (1996). Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55(3):280-289.

Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, et al. (2007). Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J. Vet. Sci.*, 8:275-282.

Lu J, Ashwell KWS, Waite P. (2000). Advances in secondary spinal cord injury – role of apoptosis. *Spine*, 25(14):1859-1866.

Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. (2005). BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp. Neurolo.*, 191:344-360.

Mahmood A, Lu D, Wang L, et al. (2002). Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 19:1609-1617.

Maitra B, Szekely E, Gjini K, et al. (2004). Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T cell activation. *Bone Marrow Transpl.*, 33:597-604.

Majumder M, Thiede M, Mosca J. (1998). Phenotype and functional comparison of cultured of marrow derived mesenchymal stem cells and stomal cells. *J. Cell Physiol.*, 176:57-66.

McDonald, JW, Liu XZ, Qu Y, et al. (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* 5:1410-1412.

Meirelles L da S e Nardi NB (2009). Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci.*, 14:4281-4298.

Nomura T, Honmou O, Harada K, et al. (2005). I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*, 136:161-169.

Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al. (2002). Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J. Neurosci. Res.*, 69:925-933.

Okano, H.; Ogawa, Y.; Nakamura, M.; Kaneko, S.; Iwanami, A.; Toyama, Y. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Semin Cell Develop. Biol.* 14:191-198; 2003.

Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. (2010). Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res.*, 1343:226-235.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284:143-147.

Radojicic M, Reier PJ, Steward O, et al. (2005). Septations in chronic spinal cord injury cavities contain axons. *Exp. Neurol.*, 196:339-341.

Ramsey JBG, Ramer LM, Inskip JA, et al. (2010). Care of rats with complete high-thoracic spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, 27:1709-1722.

Rodrigues Hell RC, Costa MMS, Goes AM, et al. (2009). Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobi. Disease.*, 33:290-300.

Santos-Benito FF, Munoz-Quiles C, Ramon-Cueto A. (2006). Long-term care of paraplegic laboratory mammals. *J. Neurotrauma*, 23:521-536.

Sasaki M, Radtke C, Tan AM, et al. (2009). BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, 29:14932-14941.

Standard neurological classification of spinal cord injury. ASIA – American Spinal Injury Association. Disponível em: http://www.asia-spinalinjury.org/publications/2006_Classif_worksheet.pdf. Acessado em: 20 de novembro de 2010.

Tator CH e Fehlings MG (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.*, 75:15-26.

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75:389–397.

Urdzíkova L, Jendelová P, Glogarová K, et al., (2006). Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma*, 23:1379-1391.

Vialle EM, Vialle LR, Bleggi-Torres LF, et al., (2007). Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos. *Rev. Bras. Ortop.*, 42:101-103.

Wang L, Li Y, Chen J, et al. (2002). Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp. Hematol.*, 30:831-836.

Westgren N e Levi R. (1998). Quality of life and traumatic spinal cord injury. *Arch Phys. Med. Rehabil.*, 79(11):1433-1439.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cell differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.*, 61:364-370.

Xu K, Chen Q, Li F, et al. (2009). Spinal cord decompression reduces rat neural cell apoptosis secondary to spinal cord injury. J. Zhejiang. Univ. Sci. B., 10(3):180-187.