

MARTA ROCHA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOFLUORESCENTE DA LESÃO
COMPRESSIVA NA MEDULA ESPINHAL 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
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A663a
2013

Araújo, Marta Rocha, 1987-

Avaliação histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinhal de ratos wistar tratados com células-tronco mesenquimais / Marta Rocha Araújo. – Viçosa, MG, 2013.

xi, 34f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Clovis Andrade Neves

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 26-34

1. Células-tronco. 2. Medula espinhal - Ferimentos e lesões.
3. Terapia celular. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 571.836

MARTA ROCHA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOFLUORESCENTE DA LESÃO
COMPRESSIVA NA MEDULA ESPINHAL 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
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*

APROVADA: 28 de Fevereiro de 2013

Betânia Souza Monteiro

Ricardo Junqueira Del Carlo

Clóvis Andrade Neves
(Orientador)

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

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nos momentos difíceis e me dar força interior para superar as dificuldades.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo do Programa REUNI que permitiu a realização do meu trabalho.

Ao professor Clóvis Andrade Neves pela orientação durante o desenvolvimento desse projeto, pelos ensinamentos, atenção e dedicação.

Ao professor Ricardo Junqueira Del Carlo pelo apoio e incentivo sempre que precisei, e pela oportunidade e confiança depositada.

À professora Betânia de Souza Monteiro da Universidade de Vila Velha, pela colaboração com esse projeto.

Ao professor Joaquin Hérnan Patarroyo Salcedo por viabilizar as etapas de cultivo celular.

Ao professor Antônio José Natali, por apoiar as etapas de manutenção dos animais.

Às alunas de iniciação científica Bárbara e Taís, pela ajuda, dedicação e amizade. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento de todo o projeto.

Ao amigo Pablo Herthel que me auxiliou em todo o projeto. Muito obrigada pela disponibilidade de vir a Viçosa sempre que precisei. Sua ajuda foi fundamental para a conclusão do experimento.

À todos os professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo exemplo de profissionalismo e pelo aprendizado ao longo do curso.

À todos os colegas do Laboratório de Biologia Estrutural, em especial ao Rômulo pelo ajuda em algumas análises.

Aos amigos do curso da Pós-Graduação, em especial às “Flores”, grata pela amizade, companhia e pelos ótimos momentos.

Aos meus pais Fábio e Silvana, por fazerem tudo possível. Pelo carinho, paciência, incentivo e apoio incondicional. Amo vocês!

Aos meus irmãos Fabiana e Daniel que sempre permaneceram ao meu lado nos bons e maus momentos.

Ao Gabriel, por me dar força nos momentos mais difíceis, pelo companheirismo, carinho e compreensão.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
Animais	6
Grupos e tratamentos	6
Cultura e caracterização das células-tronco mesenquimais	6
Marcação e transplante das células-tronco mesenquimais	8
Lesão medular	8
Avaliação histológica	9
Imunofluorescência	10
Análise estatística	12
RESULTADOS	13
Caracterização das CTM derivadas da medula óssea	13
Nanomarkação das CTM	15
Lesão Medular	15
Destino das células transplantadas	16
Avaliação Histológica da lesão	16
Avaliação Imunofluorescente da lesão	17
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

LISTA DE FIGURAS

Figura1 - Esquema dos mecanismos que ocorrem após a lesão medular traumática.....	2
Figura 2 - Representação esquemática da porção da lesão utilizada nesse estudo.	10
Figura 3 - Fotomicrografias das CTM indiferenciadas <i>in vitro</i> 48 horas após o plaqueamento	13
Figura 4 - Fotomicrografias das CTM da quarta passagem sob diferenciação osteogênica e adipogênica <i>in vitro</i>	14
Figura 5 - Caracterização imunofenotípica das CTM de ratos Wistar por citometria de fluxo.	15
Figura 6 - Imagens de microscopia de fluorescência após nanomarcção com Q-tracker®	16
Figura 7 - Porcentagem de área lesionada por grupo.....	17
Figura 8 - Fotomicrografias em coloração de HE da porção da medula espinhal de rato submetido a lesão compressiva medular.....	17
Figura 9 - Avaliação imunofluorescente da lesão medular.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASIA - *American Spinal Injury Association*
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTM - Células-tronco mesenquimais
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
GFAP - *Glial fibrillary acidic protein*
GFP - *Green fluorescent protein*
HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
MSC - *Mesenchymal stem cells*
NGF - Fator de crescimento neural
PBS - Salina tamponada com fosfato
PBS-T- Salina tamponada com fosfato com adição de tween 20 1%
SCI - *Spinal cord injury*
SFB - Soro fetal bovino
SN - Sistema nervoso
SNC - Sistema nervoso central
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

ARAÚJO, Marta Rocha. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2013. **Avaliação histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinhal de ratos wistar tratados com células-tronco mesenquimais.** Orientador: Clóvis Andrade Neves.

A lesão traumática da medula espinhal geralmente resulta em déficits neurológicos graves e, na maioria, irreversíveis. As terapias celulares representam uma nova estratégia para o tratamento destas lesões, sobretudo, com a utilização de células-tronco (CT); que experimentalmente vem exibindo resultados satisfatórios em vários modelos animais. O presente trabalho comparou a lesão da medula espinhal em animais tratados e não-tratados com células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea. As CTM foram obtidas da medula óssea de ratos Wistar, cultivadas, caracterizadas, nanomarcadas com Qtracker 655® e transplantadas na sexta passagem para animais com lesão medular. A lesão espinhal compressiva foi realizada com insuflação de 50µL, de solução salina, do cuff do cateter de Forgat n.º 2 Fr. no espaço epidural T8, durante 5 minutos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais com 15animais em cada e submetidos a tratamentos distintos: grupos controles (GC), que sofreram somente a lesão medular e grupos tratados (GT), que sofreram a lesão medular e receberam o transplante de células na concentração de $1,0 \times 10^7$ células/mL de tampão fosfato salino(PBS), 3 horas após a lesão. Realizou-se a eutanásia dos animais com 24 horas, 7 e 21 dias pós-lesão. Por microscopia de luz, foi mensurado o percentual de área lesionada no fragmento da lesão macroscópica. Também foi investigado, por microscopia de fluorescência, o efeito das CTM sobre a inflamação, reatividade astrocítica e ativação de células-tronco endógenas. Embora as CTM não tenham sido encontradas no local da lesão, na avaliação imunofluorescente foi visto que nos animais tratados com CTM houve atenuação significativa da resposta inflamatória com redução no número de macrófagos/micróglia marcados com anti-CD68 (ED1); diminuição da imunorreatividade dos astrócitos (GFAP+) e maior ativação de células-

tronco endógenas (nestin+). Nossos resultados indicam que o transplante de CTM tem ação benéfica sobre a recuperação da lesão traumática da medula espinhal. Como as CTM transplantadas nanomarcadas não foram observadas no local da lesão, sugerimos que o efeito terapêutico dessas células pode ocorrer por algum tipo de mecanismo telécrino.

ABSTRACT

ARAÚJO, Marta Rocha. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Histological and immunofluorescent evaluation of compressive lesion in the spinal cord of Wistar rats treated with mesenchymal stem cells.** Advisor: Clóvis Andrade Neves.

The traumatic spinal cord injury often results in severe neurological deficits, and mostly irreversible. The cell therapy represents a new strategy for the treatment of these lesions, particularly with the use of stem cells (SC), with satisfactory results in several experimental models. This study compared the spinal cord injury in animals treated and not treated with mesenchymal stem cells (MSC) from bone marrow. MSCs were obtained from bone marrow of rats, cultured, characterized, labeled with Qtracker 655® and transplanted in the sixth passage in animals with spinal cord injury. Spinal cord injury (SCI) was performed with 2-Fr Fogarty catheter after T9-T10 laminectomy. The animals were randomly divided into six experimental groups of 5 animals each and submitted to different treatments: control group (CG), with only spinal cord injury and treated groups (GT) that suffered the SCI and received transplants of cells 3 hours after injury. The animals were euthanized 24 hours, 7 and 21 days post-injury. For light microscopy, was measured the percentage of lesion area in the fragment of macroscopic lesion. We also investigated, by fluorescence microscopy, the effect of MSC on inflammation, astrocytic reactivity and activation of endogenous stem cells. There was no statistical difference between GC and MSC as the size of the lesion area. Although MSC were not found at the site of the lesion, in the evaluation immunofluorescent was seen in the animals treated with MSC was significant attenuation of the inflammatory response with a reduction in the number of macrophages labeled with anti-CD68 antibody (ED1), decreased immunoreactivity of astrocytes (GFAP+) and greater activation of endogenous stem cells (nestin+). Our results indicate that cell transplantation has a beneficial effect on recovery from traumatic spinal cord injury. As MSC transplanted nanolabeling were not observed at the

lesion site, we suggest that the therapeutic effect of these cells can occur by some telecrine mechanism.

INTRODUÇÃO

As lesões medulares acometem anualmente milhares de indivíduos de todas as faixas etárias, com elevadas taxas de mortalidade e morbidade crônica (Sumida et al., 2001; Saunders et al., 2009).

A lesão medular foi definida pelo Banco de Dados Nacional de Lesão Medular (NSCID) em 2013, como toda injúria às estruturas contidas no canal medular (medula, cone medular ou cauda eqüina), resultando em perda temporária ou permanente das funções motora, sensorial e/ou autonômicas.

A gravidade da lesão medular depende da intensidade, velocidade e duração de forças endógenas ou exógenas sobre a medula espinhal (Bagley et al., 1999). A lesão de origem não-traumática(endógena) decorre de extrusão ou protrusão de disco intervertebral, fraturas patológicas (metástases vertebrais, tuberculose, osteomielite e osteoporose) e anormalidades congênitas(estenose de canal medular e deformidades graves da coluna). Já as lesões de origens traumáticas (exógenas) incluem lesões por acidentes automobilísticos, armas de fogo, objetos penetrantes e quedas, representando 80% do total das lesões medulares (Lianza et al., 2001).

Os danos causados na medula espinhal após uma lesão traumática envolvem dois eventos (Figura 1).O primeiro consiste no mecanismo inicial da lesão que ocorre no momento do trauma, por meio de: contusão, compressão, estiramento e laceração envolvendo a ruptura e o esmagamento de elementos neurais e vasculares imediatos.O segundo, consiste nas lesões endógenas secundárias que são desencadeadas em resposta à lesão inicial aguda e que ocorrem ainda dentro da primeira semana após o trauma. A lesão secundária é caracterizada por uma maior destruição de neurônios e células gliais, redução do fluxo sanguíneo espinhal, isquemia, inflamação, peroxidação lipídica induzida por radicais livres e influxo celular de cálcio, levando a uma expansão significativa dos danos (Liu et al., 2006; Sobani et al., 2010; Ning et al., 2012).

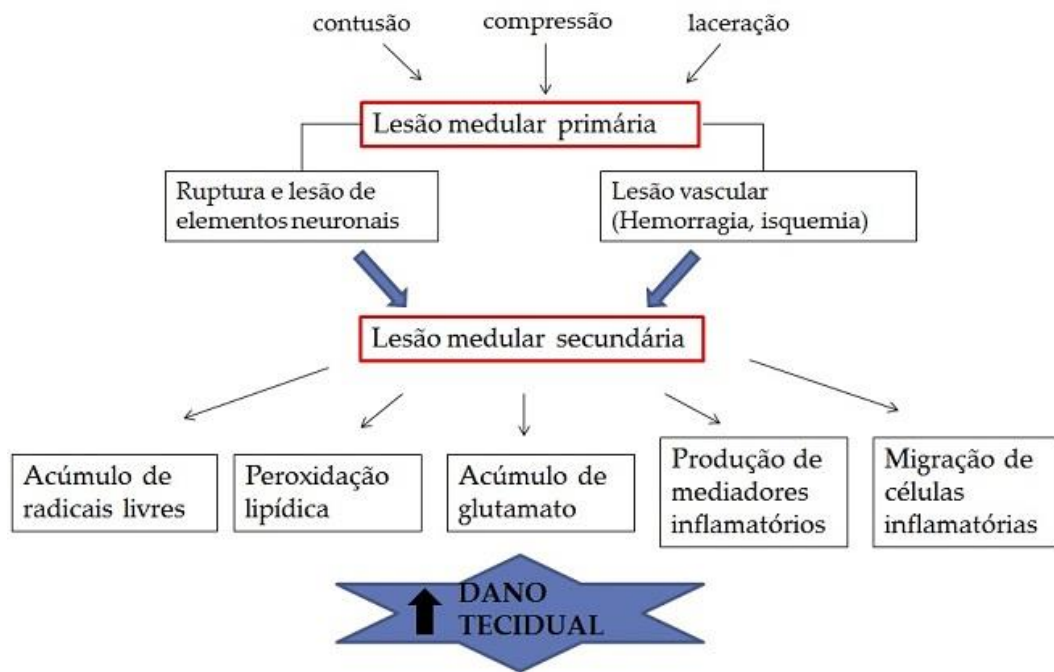


Figura 1. Esquema dos mecanismos que ocorrem após a lesão medular traumática.

Outra consequência da lesão medular é a formação de cicatriz glial que impede a regeneração do axônio. Após lesão do sistema nervoso central(SNC), os astrócitos adquirem característica hipertrófica acompanhada por aumento na produção de filamentos intermediários tais como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) - um processo chamado de astrocitose reativa ou astrogliose (Fawcett, 1999; Sahni, 2010). Com o tempo, mais tipos de células, incluindo a microglia, macrófagos e células progenitoras, são recrutadas, culminando na formação da cicatriz glial. Esta estrutura apresenta um problema para a regeneração axonal: atua como uma barreira física e acumula moléculas que inibem o crescimento axonal, tais como proteoglicanos de sulfato de condroitina (Zuo et al., 1998; Busch e Silver, 2007).

Ainda não existem tratamentos efetivos para a lesão medular, mas vários ensaios clínicos têm fornecido informação acerca da regeneração de neurônios lesionados e proteção de danos adicionais para as células remanescentes. Uma das opções de tratamento é o clínico (farmacológico), a fim de interromper alguns dos mecanismos fisiopatológicos da lesão secundária (McDonald e Sadowsky, 2002; Hyun

e Kim, 2010). Os corticosteroides, como a metilprednisolona, têm sido amplamente utilizados após lesão medular aguda em humanos e pacientes veterinários, apesar de sua eficácia ser questionada (Rabchevsky et al., 2002; Arias et al., 2007). Evidências sugerem que seu efeito se deve, principalmente, à capacidade de inibir a peroxidação lipídica quando empregados em altas dosagens logo após a lesão. Outra opção de tratamento é o cirúrgico, porém este limita-se à descompressão da medula espinhal, retirada de fragmentos e estabilização da coluna vertebral (Pratt et al., 1990).

Frente às controvérsias e resultados divergentes com fármacos, estudos têm avaliado inúmeras estratégias terapêuticas. Segundo Cizkova et al. (2010), devido a incapacidade de auto-reparação da medula espinhal após a lesão, as intervenções terapêuticas exigirão a combinação de alguns protocolos: (1) atenuação dos processos da lesão secundária (como inflamação e a excitabilidade provocada pelo glutamato) e inativação de inibidores de crescimento axonal; (2) estimulação da neurogênese endógena, gerando novos progenitores espinhais; e (3) substituição das células mortas (neurônios e oligodendrócitos), induzindo assim um ambiente mais favorável para a regeneração de células afetadas, reposição da bainha de mielina e restabelecimento funcional das conexões axonais e neuronais perdidas. A terapia celular encontra-se entre essas estratégias (Cizkova et al., 2006; Cristante, 2007).

Diversas pesquisas têm explorado o potencial da terapia celular, utilizando o transplante de vários tipos de células, como as células de Schwann (Biernaskie et al., 2007; Saberi et al., 2008), células-tronco neurais (Schultz, 2005; Tarasenko et al., 2007; Parr et al., 2008), células-tronco mesenquimais (Chopp et al., 2000; Osaka et al., 2010), fibroblastos (Tobias et al., 2003; Wong et al., 2008) e células olfativas *ensheathing* (OECS) (Pearse et al., 2007; Guest et al., 2008).

O transplante com células-tronco mesenquimais (CTM) é uma das opções promissoras devido à habilidade de auto-renovação e alta capacidade de proliferação (Barry e Murphy, 2004) além de serem capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, incluindo os

neurônios (Zuk et al., 2002; Kern et al., 2006). Estas células podem ser colhidas a partir de medula óssea e de forma fácil e rápida expandidas *in vitro*. Esta acessibilidade as torna uma interessante estratégia para o transplante autólogo e também para o transplante alogênico (Monteiro et al., 2010).

A melhora funcional após a lesão medular experimental com o uso de células-tronco vem sendo demonstrada por vários autores (Ankeny et al., 2004; e Urdzikova et al., 2006). Um recente trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou melhora significativa no sétimo dia de avaliação nos animais do grupo tratado com CTM comparado com os animais do grupo controle, demonstrando contribuição positiva e precoce no processo de recuperação da função motora (Carvalho, 2011).

Alguns estudos indicam a capacidade das CTM em modular o ambiente lesionado do SNC e promover reparação a partir da secreção de fatores anti-inflamatórios, de moléculas anti-apoptóticas e fatores tróficos capazes de favorecer o crescimento axonal e a imunomodulação. E capaz ainda, de estimular a remielinização e a angiogênese. (Poll et al., 2008; Meirelles et al., 2009; Uccelli et al., 2011; Quertainmont et al., 2012). Além disso, as CTM são capazes de se diferenciarem em células neuronais não somente *in vitro*, mas também *in vivo* após o transplante (Greco et al., 2008; Xu et al., 2010), tornando-se uma estratégia viável para a substituição de neurônios lesados.

Diferentes modos de administração têm sido utilizados para o transplante das CTM após a lesão medular: intratecal (Nirmeen al., 2010), intravenoso (Osaka et al., 2010) ou intra-espinhal (Roussos et al, 2005). Para aplicação em seres humanos, a injeção intravenosa parece ser a forma mais fácil, pois não há risco de danos adicionais para a medula espinhal do paciente. Além disso, a injeção intravenosa de CTM é segura, uma vez que tem sido demonstrado que não têm efeito adverso como a obstrução da circulação do sangue ou de tumorigenicidade (Karussis et al., 2010; Ra et al., 2011).

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi comparar os padrões histopatológicos da lesão compressiva da medula espinhal de ratos não-tratados e tratados com injeção intravenosa de CTM originada na medula óssea; avaliar se as CTM migram e/ou permanecem no local da lesão; analisar, *in situ*, os efeitos das CTM transplantadas sobre as células-tronco/progenitoras neural (*Nestin*+), sobre os astrócitos (GFAP+) e sobre a micróglia/macrófagos (CD68+), no 7^o e 21^o dia pós-lesão.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Para os procedimentos de lesão da medula espinhal foram utilizados 30 ratos Wistar machos, de três meses de idade, pesando entre 250 a 300g; e para coleta da medula óssea, 4 ratos Wistar machos de 45 dias de idade. Todos oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa.

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 nº 38/2012.

GRUPOS E TRATAMENTOS

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos, sendo:

- Grupo controle - 15 animais com laminectomia e lesão medular.
- Grupo tratado - 15 animais com laminectomia e lesão medular que receberam o transplante de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM) na concentração de $1,0 \times 10^7$ células/mL de PBS, 3 horas após a lesão, por via endovenosa.

Foi realizada a eutanásia dos animais com 24 horas (n=10), 7 dias (n=10) e 21 dias (n=10) pós-lesão para retirada da medula espinhal, pulmão e baço.

CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Foram coletadas células das medulas ósseas dos fêmures dos quatro animais doadores para obtenção das CTM. Estas foram cultivadas em garrafas de culturas com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) baixa glicose, 3,7g/L de bicarbonato de sódio e com adição de

10% de soro fetal bovino (SFB), 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. O meio de cultura foi trocado a cada três dias.

Células na quarta passagem foram submetidas aos testes de diferenciação osteogênica e adipogênica. As células foram desprendidas das garrafas T-75cm² com tripsina-EDTA e plaqueadas em placas de 6wells (TPP - Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) na concentração de 1 x 10⁴ células/well. Para diferenciação osteogênica o meio DMEM com 10% de SFB foi enriquecido com 10⁻⁸ mol/mL de dexametasona (Sigma), 5µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma) e 10mmol/L de β-glicerofosfato (Sigma).

Para a diferenciação adipogênica o meio DMEM sem SFB foi enriquecido com 10⁻⁸ mol/mL de dexametasona (Sigma), 10⁻⁸ M de insulina recombinante humana, 200µM de indometacina cristalina e 500µM de isobutil-metilxantina. Os meios de diferenciação foram trocados a cada 3 dias por 28 dias. Após esse tempo, amostras das células foram fixadas por 1 hora em paraformaldeído a 4% e coradas pela técnica de Von Kossa + HE para detecção de depósitos de cálcio na matriz e Oil Red O para a detecção de vesículas de lipídeos intracelulares. Para cada teste de diferenciação foi cultivado um grupo controle das células em meio DMEM com 10% SFB. Os testes de diferenciação foram realizados em triplicata.

Na imunofenotipagem, as amostras de células da quarta passagem foram incubadas com os anticorpos primários anti-CD11b clone M1/70 mouse, anti-CD45 clone 69 mouse, anti-CD90 clone Ox-7 mouse, anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse, anti-CD54 clone 1A29 mouse e anti-HLA-DR (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®.

MARCAÇÃO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Doze (12) horas antes do transplante, células da sexta passagem foram 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 a 22°C por 5 minutos em 1500rpm 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 armazenadas em caixa de isolamento térmico até o momento da aplicação intravenosa.

Uma dose foi preparada para avaliação à fresco em microscópio de fluorescência para comprovar a eficácia da nanomarcagem.

Com auxílio de cateter intravenoso 24G que foi inserido na veia lateral da cauda, a suspensão de $1,0 \times 10^7$ células/mL foi injetada 3 horas após a lesão espinal.

LESÃO MEDULAR

Os animais receberam analgesia pré-emptiva 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 antimicrobiana profilaxia com enrofloxacin (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, com auxílio de microscópio cirúrgico, foi realizada laminectomia das vértebras T9 e T10 com broca trefina de 4mm de diâmetro em perfuratriz elétrica.

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 preenchido com 50µL de solução salina e mantido desta forma por cinco

minutos, realizando a compressão da medula espinhal. Os animais foram avaliados 24 horas após o procedimento para observar a presença da paraplegia.

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, durante 3 dias. Os animais permaneceram no biotério sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo anteriores ao procedimento cirúrgico.

Após a lesão medular, pressão manual da bexiga foi realizada seis 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.

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 e com potencial de reversão.

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

No 7º e 21º dia pós-lesão foi realizada a eutanásia de dez animais de cada grupo, por sobredosagem anestésica intraperitoneal de Tiopental sódico. Posteriormente, a medula foi rapidamente removida do canal espinhal e um fragmento de 2 cm de comprimento, contendo a lesão macroscópica ao centro foi fixado em paraformaldeído 4% tamponado, pH 7.4 a 4°C por 24 horas. Transcorrido esse período, o material foi acondicionado em álcool 70º e processado para avaliação histológica.

Previamente à inclusão, as amostras de cada grupo foram seccionadas em três fragmentos: porção cranial à lesão macroscópica, porção da lesão e porção caudal à lesão macroscópica.

A porção da lesão de cada animal foi incluída em Paraplast® (Merck) e secções transversais, de 6µm de espessura, foram feitas a partir da porção cranial ao epicentro da lesão (Figura 2). Em cada lâmina histológica foram acondicionadas 10 secções seriadas, obtidas com intervalo mínimo de 60µm. Algumas secções histológicas desse intervalo

foram colocadas em lâminas próprias para avaliação imunológica (ImmunoSlide-EasyPath) e avaliadas por imunofluorescência.

Para avaliação em microscopia de luz as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e fotografadas doze imagens por animal em microscópio ótico Olympus BX-60® (Tóquio, Japan) para posterior análise.

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 analisada a relação de área lesada/área total de cada secção determinada, utilizando o software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Bethesda, EUA).

Adicionalmente foi realizado exame histopatológico da lesão compressiva da medula espinhal dos ratos não-tratados e tratados com injeção intravenosa de CTM.

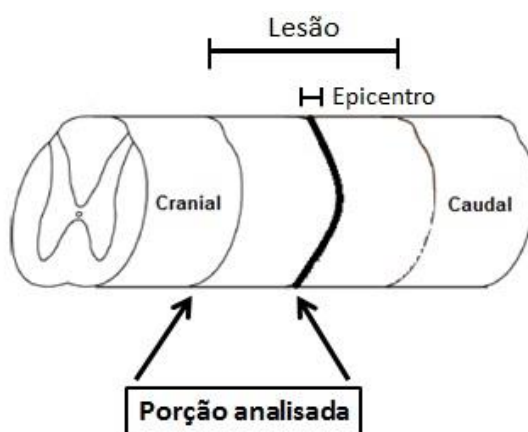


Figura 2. Representação esquemática da porção da lesão utilizada nesse estudo. Foram feitas secções seriadas de 6µm transversalmente ao plano sagital mediano, sendo intercaladas as lâminas para avaliação histológica e imunofluorescente a cada 60µm.

IMUNOFLUORESCÊNCIA

Foi realizada a imunofluorescência do Qtracker 655®, na medula lesionada, no pulmão e baço, utilizando filtro de excitação WG, para avaliar o destino das células transplantadas.

Também para avaliação em microscopia de fluorescência, cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol até água. Recuperação antigênica

foi realizada em tampão citrato pH 6,0 (em banho maria a 95^o) por 50 minutos.

Posteriormente à recuperação antigênica, as secções foram lavadas com PBS-T (PBS 1X + Tween 20 a 1%) uma vez por 5 minutos, tratadas com solução de bloqueio (Leite em pó Mollico® desnatado 1%) por 15 minutos. Incubação com os respectivos anticorpos primários. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal anti-CD68(ED1) (Santa Cruz, Cat. no. sc-59103) diluição 1:50, para identificação de monócitos e macrófagos ativados; anticorpo policlonal obtido em coelho anti-proteína glial fibrilar ácida (Invitrogen, Cat. no. 18-0063) diluição 1:50, para identificação de astrócitos; e anticorpo policlonal obtido em camundongo anti-nestin (AbD Serotec, Cat. no. 6625-1010) diluição 1:50, para identificação de células-tronco/progenitoras neurais.

As lâminas foram incubadas *overnight* a 4^oC. Após o tratamento com os anticorpos primários, os cortes foram lavados três vezes com PBS e então incubados com os anticorpos secundários por 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-IgG de camundongo produzidos em cabra e conjugado com DyLight® 488 (AbD Serotec, Cat. no. STAR74D488GA) diluição 1:100 e anti-IgG de coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, Cat. no. F1262) diluição 1:100. As secções foram então novamente lavadas com PBS e montadas com lamínulas utilizando meio de montagem contendo DAPI (Vectashield® mounting medium with DAPI, Vector Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Para controle da eficácia da imunomarcação, em cada lâmina, duas das secções histológicas foram incubadas com PBS ao invés da solução contendo o anticorpo primário.

Foram capturadas cinco imagens por secção utilizando microscópio de fluorescência (Olympus BX-60®, Tokyo, Japan). As células marcadas foram quantificadas com auxílio do software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Bethesda, EUA), utilizando uma grade com 143 pontos sendo contados os pontos de interseções das linhas que caíam sobre as células.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação de dados quantitativos das células marcadas na avaliação imunofluorescente os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e em seguida foi utilizado o teste t. Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Os valores de área total e área de lesão foram avaliados segundo o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney.

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

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 91,80%.

As células cultivadas demonstraram aparência fibroblastóide em cultura (Figura 3A e 3B), 48 horas pós-plaqueamento primário, permanecendo durante todo o período de avaliação *in vitro*. Essas células apresentaram altas taxas replicativas e aderiram às garrafas de cultivo celular.

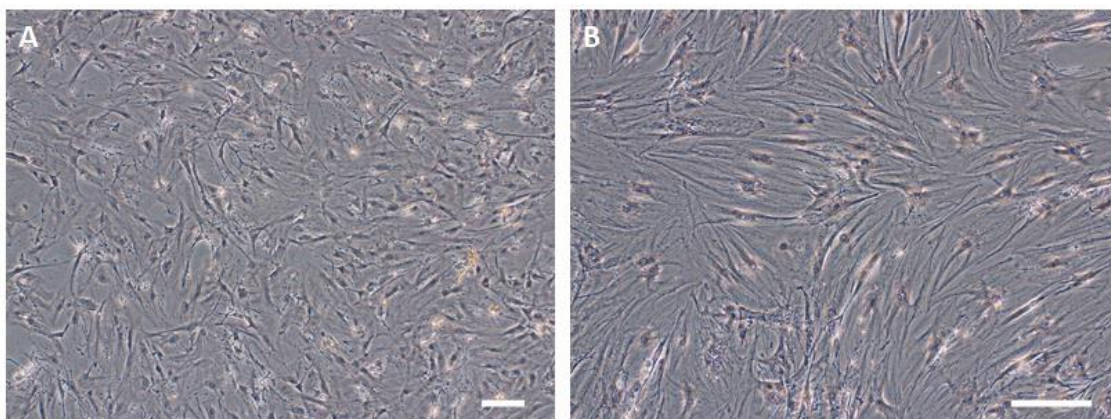


Figura 3. Fotomicrografias das CTM indiferenciadas *in vitro*. (A) Células apresentando distribuição homogênea e 80% de confluência, 48 horas pós-plaqueamento. (B) Destaque para a morfologia fibroblastóide das células. Barra: 50µm.

As células submetidas à diferenciação osteogênica demonstraram presença de matriz extracelular calcificada pela coloração de Von Kossa e hematoxilina-eosina, visualizada no 28º dia, comprovando a diferenciação em células da linhagem óssea (Figura 4A).

As CTM cultivadas em meio de cultura suplementado para indução adipogênica demonstraram ao final das quatro semanas presença de vesículas lipídicas intracelulares facilmente identificáveis sob microscopia de luz (Figura 4B).

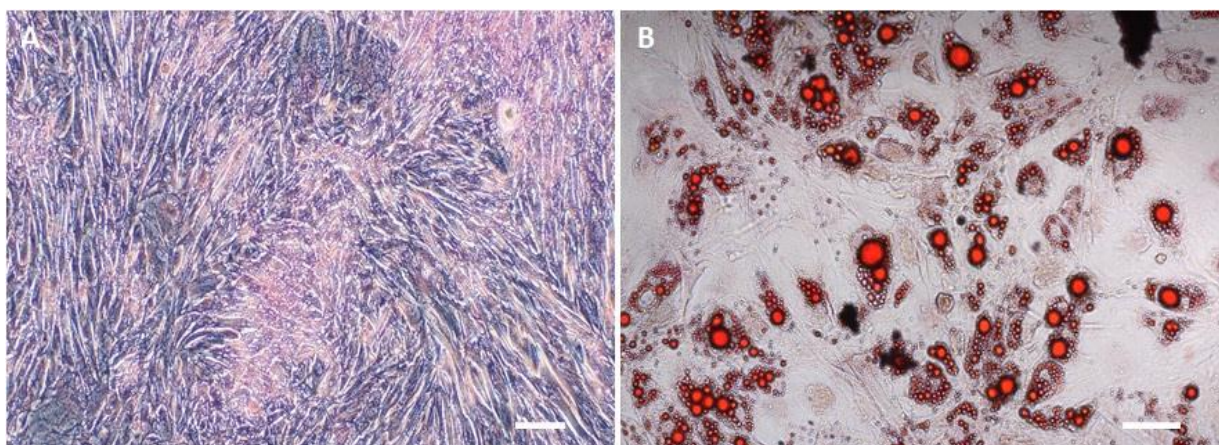


Figura 4: Fotomicrografias das CTM sob diferenciação *in vitro*: (A) Células cultivadas em meio indutor osteogênico, exibindo calcificação da matriz extracelular (regiões escuras) evidente sob coloração por Von Kossa + HE. (B) Células cultivadas em meio indutor adipogênico, coradas por Oil Red O, evidenciando em vermelho o acúmulo de gotículas lipídicas (B). Barra: 50µm.

As CTM da quarta passagem foram submetidas à imunofenotipagem com os anticorpos anti-CD11, anti-CD45, anti-CD54, anti-CD73, anti-CD90 e anti-HLA-DR (complexo de histocompatibilidade de classe II) e demonstraram expressão negativa para os marcadores de superfície CD11 (97,48%), CD45 (96,98%) e para HLA-DR (95,5%) e positiva para os marcadores CD54 (66,26%), CD73 (86,82%) e CD90 (90,30%) na avaliação por citometria de fluxo, conforme ilustra a figura 5.

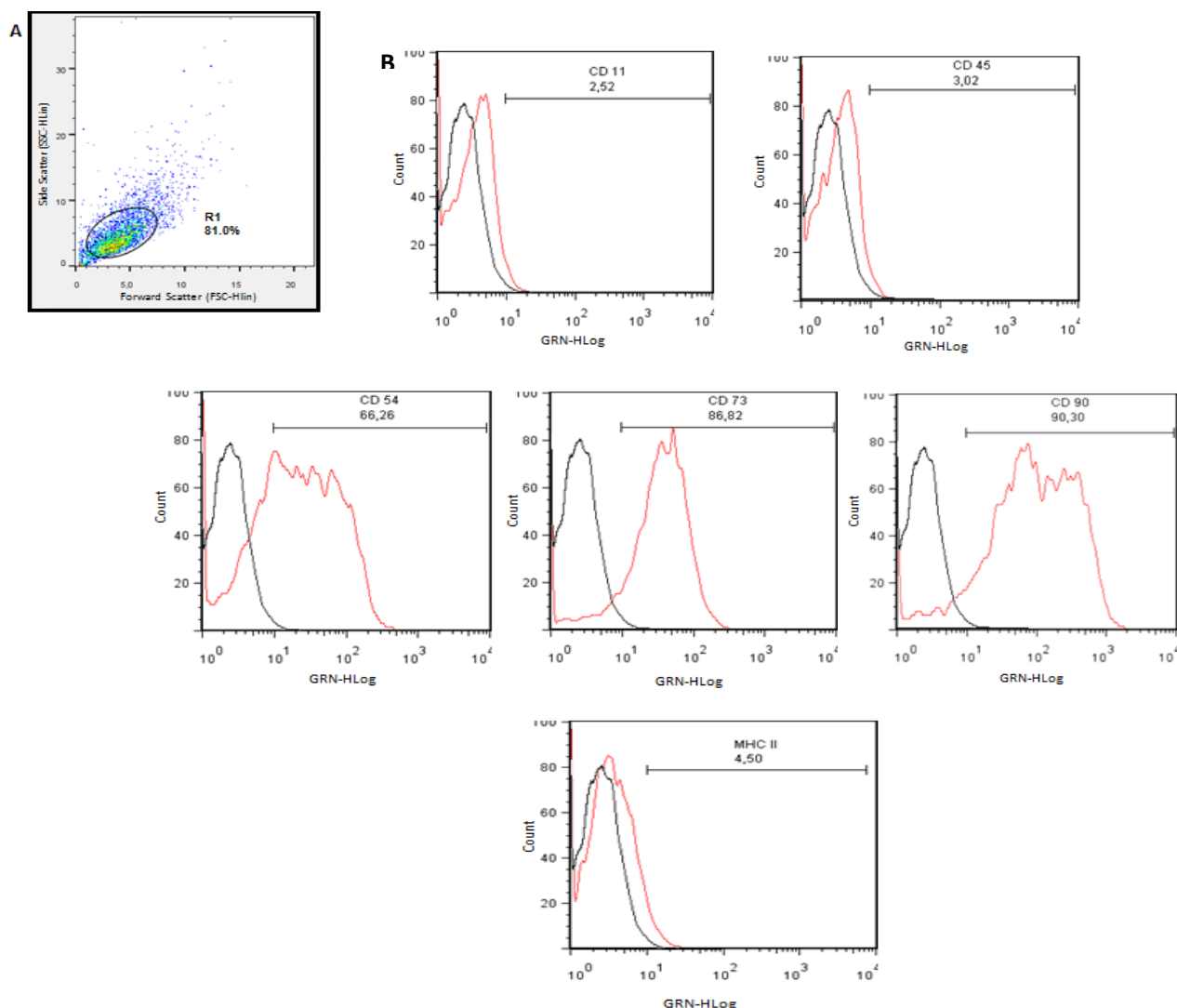


Figura 5. Caracterização imunofenotípica das CTM de ratos Wistar por citometria de fluxo. (A) População escolhida para análise apresentou 81,0% de homogeneidade. (B) A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos vermelhos) está comparada com os isotipos controle (gráficos pretos) e representada em valores percentuais. O número de células analisadas está representado no eixo y e a intensidade no eixo x.

Nanomarcação das CTM

As células previamente marcadas com o Q-tracker 655® incorporaram o marcador emitindo alta fluorescência citoplasmática (vermelho), com filtro de excitação WG. Os núcleos (azul) são mostrados com filtro de excitação WU. A figura 6A representa essa marcação nas amostras a fresco.

Destino das células transplantadas

As células transplantadas nanomarcadas foram encontradas no pulmão dos animais do grupo 24 horas (Figura 6B). Não foram encontradas células transplantadas no local da lesão nos diferentes intervalos, nem em quaisquer órgãos 7 e 21 dias pós-transplante.

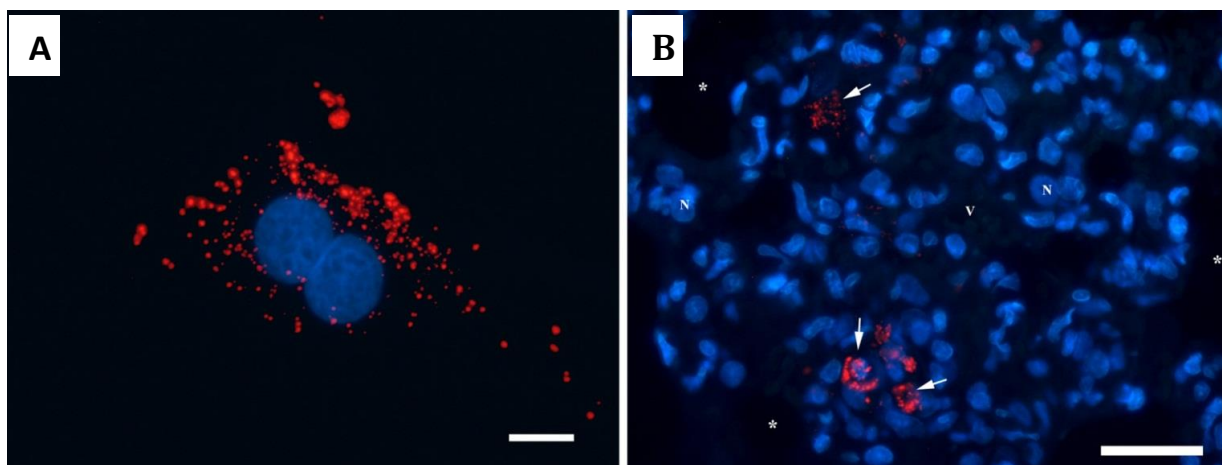


Figura 6.Imagens de microscopia de fluorescência.(A) Fotomicrografia da CTM após nanomarcção com Q-tracker®, demonstrando a fluorescência citoplasmática vermelha emitida pelas células em suspensão.Barra: 10 um.(B) Identificação das células transplantadas pós-lesão. As setas indicam as CTM presentes no pulmão do grupo 24 horas pós-lesão. Os locais marcados com * representam os alvéolos pulmonares. Os Núcleos (N) foram contra-corados com DAPI (azul).Barra: 50um.

Avaliação histológica da área de lesão

Essa análise mostrou que não houve diferença significativa entre o tamanho da lesão nos grupos tratados (CTM) e controle não havendo, a princípio, nenhuma indicação de que o tratamento teve efeito neuroprotetor tanto ao 7º quanto no 21º dia pós-lesão (Figura7). Em ambos os grupos também foi visto, por microscopia de luz, destruição de substância branca e substância cinzenta com malácia em toda a extensão do tecido, presença de células gitter e degeneração neuronal(Figura 8).

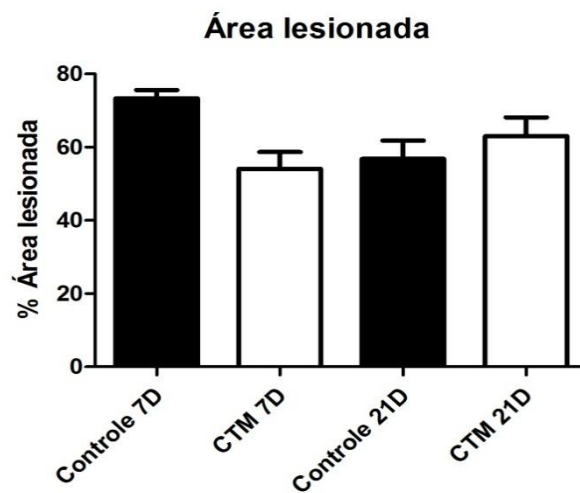


Figura 7. Porcentagem de área lesionada por grupo da avaliação histológica da lesão. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle 7 e 21 dias pós-lesão ($p > 0,05$).

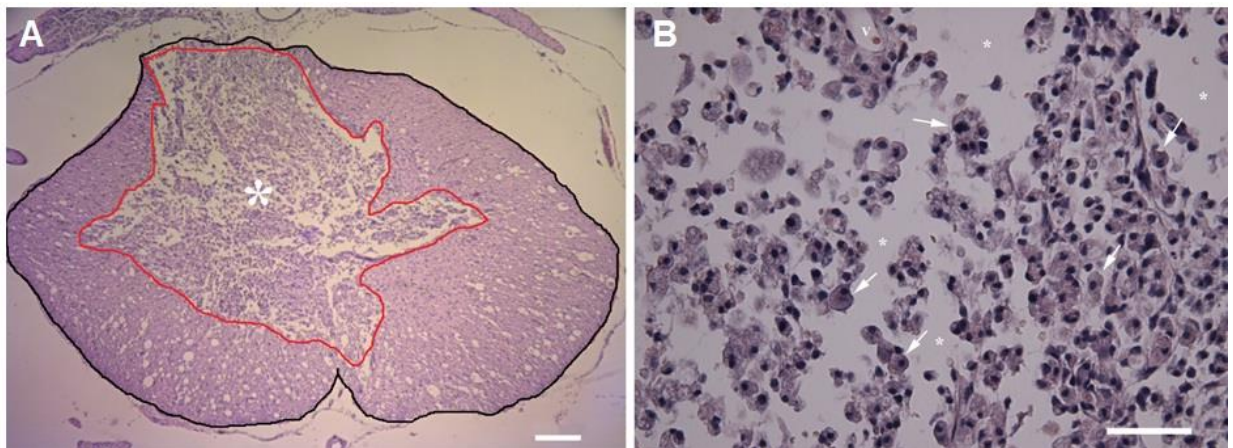


Figura 8: Fotomicrografias em coloração de HE da porção da medula espinhal de rato submetido a lesão compressiva medular. (A) Imagem representativa da lesão avaliada no 7º dia pós-lesão. O local marcado com * e contornado pela linha vermelha representa a área da lesão e a linha preta está contornando a área total da medula. Barra: 200µm. (B) Região da lesão ampliada. Malácia intensa com presença de células gitter (setas) e áreas de cavitação (*). Barra: 50µm.

Avaliação imunofluorescente da lesão

A lesão na medula espinhal resultou na ativação de macrófagos e micróglia. Macrófagos e micróglia ativados foram caracterizados por sua

morfologia arredondada e imunorreatividade ao CD68(ED-1) em ambos os grupos.

Células CD68 positivas (CD68+) concentravam-se principalmente na substância branca e ao redor da área lesionada. Nos grupos CTM, 7 e 21 dias pós-lesão, houve diminuição significativa de células CD68+ em relação aos grupos controles. A área de imunorreatividade teve média de $18,6\% \pm 0,7$ no grupo controle 7 dias, enquanto que no grupo CTM 7 dias foi $9,3\% \pm 0,6$. Já no grupo controle 21 dias a área de imunorreatividade foi $6,7\% \pm 0,6$ enquanto que no grupo CTM 21 dias foi $4,0\% \pm 0,2$ (Figuras 9A, 9B).

Após lesão na medula espinhal, astrócitos sofrem hipertrofia e se tornam reativos. Os astrócitos reativos são caracterizados pela sua intensa imunorreatividade a GFAP (proteína glial fibrilar ácida). No presente estudo, esses astrócitos foram encontrados principalmente na periferia da medula e na substância branca ao redor da lesão na porção dorsal e dorsolateral da medula, sendo nessas regiões onde se realizou a quantificação da imunorreatividade ao marcador.

A imunorreatividade a GFAP nos grupos CTM, 7 e 21 dias pós-lesão, foi significativamente menor do que nos grupos controles, sendo que a porcentagem no grupo controle 7 dias teve média de $12,8\% \pm 0,6$ comparado a $10,1\% \pm 0,5$ no grupo CTM 7 dias. Ao 21º dia pós-lesão, a imunorreatividade aumentou em relação ao 7º dia, porém no grupo CTM, $20,1\% \pm 0,6$, permaneceu significativamente menor que no grupo controle $24,8\% \pm 1,0$ (Figuras 9C, 9D).

Para avaliar a ativação de células tronco/progenitoras neurais no local da lesão espinhal e a possível influência das CTM nesse processo, utilizou-se o marcador anti-nestin.

As análises mostraram que houve ativação das células tronco/progenitoras neurais no local da lesão em ambos os grupos controle e CTM. As células foram encontradas, principalmente, na área lesionada (substância branca e cinzenta), sendo que nos grupos CTM, 7 e 21 dias pós-lesão, a quantidade de células foi significativamente maior que nos grupos controles. A porcentagem de marcação foi de $17\% \pm 0,8$

no grupo CTM 7 dias e $9,1\% \pm 0,3$ no grupo CTM 21 dias enquanto no grupo controle 7 dias foi de $12,2\% \pm 0,3$ e $5,9\% \pm 0,3$ no grupo controle 21 dias (Figuras 9E, 9F).

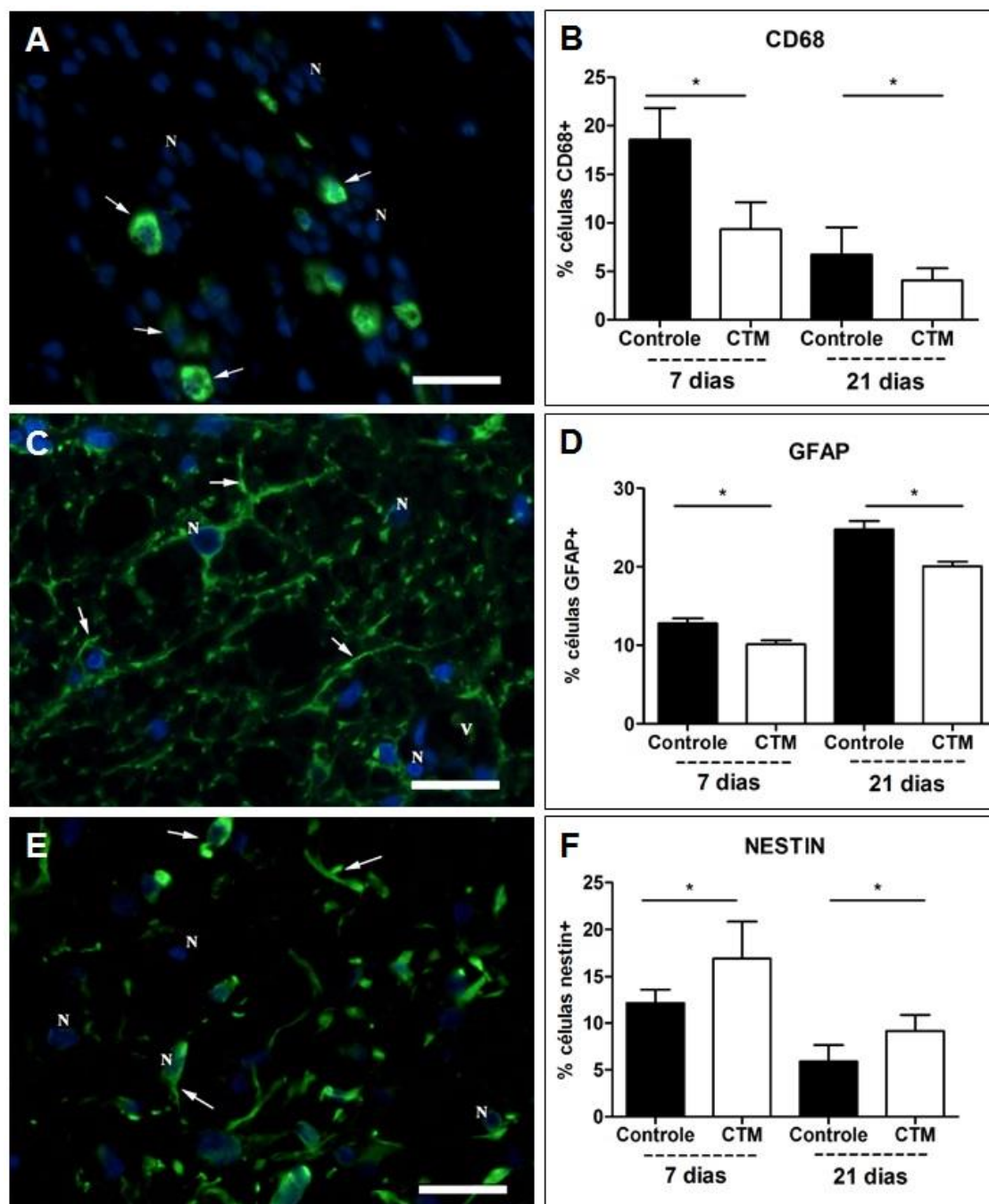


Figura 9. Avaliação imunofluorescente da lesão medular. Fotomicrografias de imunofluorescência representativas dos marcadores (A) anti-CD68 – macrófago/micróglia, (C) anti-GFAP - astrócitos e (E) anti-nestin – célula-tronco neural na lesão medular do grupo CTM 7 dias. Setas indicam células marcadas e “N” representa o núcleo das células contra-corado com DAPI (azul) Barra: 30μm. (B), (D) e (F) representam a quantificação (porcentagem) de células positivas marcadas. O * indica $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Segundo a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT) são três os requerimentos mínimos para uma população de células serem classificadas como CTM: O primeiro é que sejam isoladas de uma população de células mononucleares com base na sua aderência seletiva em cultura à superfície do plástico. O segundo é que as expressões de CD13, CD29, CD54, CD73, CD90, CD106 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79, ou CD19e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Em terceiro e mais importante, é a capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens mesodermal: osso, cartilagem e tecido adiposo (Morrison et al., 1997; Nardi e Meirelles, 2006). As células cultivadas nesse estudo apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência a placa de cultura como descrito por Pittenger et al. (1999); apresentaram expressão positiva dos marcadores celulares de superfície CD54, CD73 e CD90 e expressão negativa dos marcadores CD11b, CD45 e MHC II; e sofreram diferenciação para a linhagem óssea e adipogênica. Em conjunto, todos os critérios para classificação de CTM foram obtidos e demonstrados no estudo, comprovando que as células transplantadas foram CTM.

As análises morfométricas do presente estudo não indicaram diferenças significativas sobre a área de lesão nos animais tratados com CTM, no 7^o nem no 21^o dia pós-lesão. Resultados semelhantes foram descritos por Yoshihara et al. (2006) e Abrams et al. (2009) que também não observaram redução significativa do tamanho da lesão decorrentes do trauma raquimedular moderado em ratos tratados com CTM. Em contrapartida, outros estudos relataram redução significativa da área de lesão e maior preservação da substância branca em animais tratados, indicando efeito neuroprotetor dessas células (Ankeny et al., 2004; Bakshi et al., 2006; Urdzikova et al., 2006).

Os achados morfológicos não podem ser usados como critério único de avaliação do efeito das CTM na lesão compressiva medular, necessitando então de análises mais específicas.

A lesão da medula espinhal resulta na ativação de macrófagos/micróglia provocando intenso processo inflamatório e danificando neurônios, oligodendrócitos e astrócitos presentes na área de lesão. O processo de inflamação após lesão medular tem efeitos favoráveis e desfavoráveis (Donnelly et al., 2008), mas vários estudos *in vivo* revelaram que a modulação da inflamação promoveu melhorias em funções motoras e sensoriais (Bethea et al., 1999; Park et al., 2010). No presente estudo, observamos que a concentração de macrófagos/micróglia CD68+ na área lesionada foi significativamente menor no grupo CTM; portanto as células-tronco transplantadas atuaram no controle do processo inflamatório após lesão da medula espinhal. Tal redução na concentração de macrófagos/micróglia CD68+ pode ter atenuado os mecanismos secundários deletérios provocados pela inflamação e pode ser um fator relacionado com a restauração funcional precoce após a lesão da medula espinhal observada em estudos anteriores. Porém, o exato mecanismo pelo qual as CTM transplantadas afetam a reação inflamatória após a lesão da medula espinhal ainda não está totalmente elucidado (Park et al., 2010).

Lesões no Sistema Nervoso Central causam aumento na intensidade de marcação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) nos prolongamentos astrocitários (Bignami e Dahl, 1994). Esse fenômeno é descrito como astrocitose fibrilar reacional e está associado a hiperplasia e hipertrofia dos astrócitos. Os astrócitos reativos formam a cicatriz glial que se acumula ao redor da lesão constituindo uma barreira física e um ambiente inibitório para a regeneração axonal e a remielinização (Coutts e Keirstead, 2008).

A redução significativa da reatividade dos astrócitos nos animais tratados, observado no presente estudo sugere que as CTM podem ter reduzido a resposta dos astrócitos; e por consequência, podem agir reduzindo os efeitos inibitórios do tecido cicatricial proporcionando um ambiente mais permissivo para a extensão axonal.

A literatura tem mostrado que os astrócitos reativos parecem desempenhar um duplo papel na medula lesionada. Por um lado, acredita-se desempenhar uma função de suporte no crescimento axonal

já que produzem proteínas adesivas da matriz extracelular, como a laminina (White et al., 2008). Por outro lado, contribuem para a cicatriz glial formando uma barreira física e química (sulfato de condroitina), que inibe o crescimento axonal (Fitch e Silver, 2008). Dessa forma, segundo Escartin e Bonvento (2008), a ativação reduzida e controlada de astrócitos pode ser benéfica para a recuperação, como mostrado no estudo feito por Abramset al. (2009) onde a recuperação funcional foi associada com a redução na reatividade dos astrócitos após transplante das CTM, corroborado com nossos resultados.

As células-tronco neurais são células multipotentes com potencial para se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, e também podem ser eficientemente propagada *in vitro* (Hsuet al., 2007). O canal ependimário é conhecido como sendo uma rica fonte dessas células. Após a lesão medular, as células-tronco residentes no epêndima são ativadas proliferam e migram atingindo um pico máximo em 3-7 dias após a lesão (Moreno et al., 2009).

Nestin é um marcador bem estabelecido para célula-tronco neural e populações de células precursoras em proliferação no SNC (Wiese et al., 2004). Na medula espinhal de ratos adultos células nestin+ foram detectadas em várias áreas descritas como nichos de células-tronco/progenitoras (Wei et al., 2002). Xu et al. (2008) demonstram distintas regiões apresentando células nestin+, sendo a ordem das regiões de maior para menor quantidade: o corno dorsal, canal central e cornos ventral e lateral. Na região do corno dorsal essas células apresentaram-se distribuídas principalmente na substância gelatinosa, e no canal central distribuídas principalmente na zona ependimária.

Um recente estudo realizado por Decimo et al. (2011), mostrou que células nestin+ dotadas de propriedades proliferativas e de auto-renovação também estão presentes nas meninges da medula espinhal dos ratos adultos; no estudo essas células diferenciaram-se em neurônios e oligodendrócitos funcionais *in vitro* e após uma lesão medular proliferaram, aumentaram em número e migraram para o parênquima, sugerindo então as meninges como um possível nicho de células-tronco/progenitoras com implicação funcional na fisiopatologia do SNC.

Segundo Ronaghiet al. (2010), o recrutamento de células-tronco neurais endógenas pode ser uma alternativa para o tratamento da lesão medular, por ser uma estratégia não invasiva e que evita a necessidade de imunossupressão. No presente estudo, nossos resultados mostraram que os grupos tratados com as CTM apresentaram quantidade maior de células-tronco neurais (nestin+) no local da lesão do que nos grupos controles. Assim, o transplante de CTM pode ter influenciado o ambiente de lesão para fornecer fatores de crescimento e sinalização para a proliferação de células-tronco endógenas conforme preconizado por Urdzikova et al. (2006) e Rossi et al. (2010). Wu et al. (2003) mostraram a recuperação funcional após o transplante de CTM no momento da lesão e atribuiu isso a diferenciação aumentada de células-tronco neurais endógenas.

Nesse estudo observamos eficácia e manutenção da marcação das CTM com Qtracker655® e confirmação da viabilidade das células no momento do transplante. Essas células transplantadas foram encontradas no pulmão dos animais 24 horas pós-lesão, porém não foram encontradas no local da lesão 24h, 7 e 21 dias pós-lesão, nem em órgãos altamente vascularizados, como os pulmões e o baço 7 e 21 dias pós-lesão.

Segundo Karp e Tel (2009), o *homing* de CTM expandida em cultura e transplantada por via intravenosa é ineficiente, aparentemente devido: (1) a perda de receptores de quimiocinas e da adesão celular; (2) e ao aumento do tamanho das CTM em cultura, o qual provavelmente promove retenção de células em tecidos não específicos, incluindo o pulmão e reduz o número de CTM que atingem o sítio alvo.

No trabalho realizado por Quertainmont et al. (2012) também não foi possível encontrar na lesão, células transplantadas por via intravenosa. Não obstante, observou-se efeito benéfico das CTM transplantadas sobre a capacidade de locomoção e aumento significativo da expressão do fator de crescimento neural (NGF) no tecido lesionado, sugerindo fortemente que as CTM atuam através de suas secreções e não, necessariamente, pela sua própria integração/diferenciação dentro do tecido hospedeiro. Kurozumi et al., (2004), Lu et al., (2005) e Quertainmont et al., (2012), provaram que CTM são capazes de secretar fatores de crescimento e

citocinas, como o fator de crescimento neural(NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro(BDNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias como IFN- γ e IL-10. Estas citocinas e fatores tróficos podem ter um efeito benéfico após a lesão espinhal sobre a reparação e reorganização das conexões neuronais; na indução de regeneração; estimulando a neurogênese; no crescimento axonal; na redução da resposta inflamatória e na proteção do tecido.

Diferentes estudos utilizando as CTM, têm mostrado resultados variados em relação a sobrevivência e integração no tecido lesionado; bem como nos seus efeitos sobre a reparação. Essas discrepâncias podem estar relacionadas à diferença entre os doadores das células, como mostrado por Neuhuber et al. (2005) que ao examinar o perfil de secreção de determinados fatores de crescimento e citocinas na lesão espinhal de ratos, obtiveram diferenças significativas entre os quatro doadores humanos das CTM. Entretanto outro fator para essa variabilidade pode ser diferenças no método de cultura como: número de passagens, duração da cultura (Neuhuber et al., 2008), privação de soro (Sauerzweig et al., 2009) ou condições de hipóxia (Grayson et al., 2007).

Além disso, existem as subpopulações de CTM com propriedades distintas. Há uma gama ampla de marcadores descritos, mas cada grupo de investigadores usa diferentes marcadores, nenhum deles específico ou exclusivo(Jansen et al., 2010; Tetzlaff et al., 2011). Usando diferentes marcadores, alguns autores são capazes de selecionar subpopulações das CTM. Bakondi et al. (2009) mostraram que duas subpopulações de CTM derivadas da medula óssea humana, CD133 e CD271, apresentam diferença significativa na secreção de citocinas e fatores de crescimento. Então, podemos dizer que dependendo do doador e da forma como uma população de CTM é cultivada seleciona algumas sub-populações com diferentes características e propriedades podendo resultar em diferentes efeitos após seu transplante.

CONCLUSÃO

As avaliações realizadas no presente experimento demonstraram que a aplicação de CTM por via endovenosa tem ação benéfica sobre a recuperação da lesão traumática da medula espinhal, pois contribuíram para atenuar a reatividade dos astrócitos e a ativação de macrófagos/micróglia além de exibir capacidade em estimular a ativação de células-tronco neurais endógenas no local da lesão. Estes resultados são significativos porque demonstram o potencial de CTM em servir como atenuadores da resposta imune. Como as CTM transplantadas com o marcador fluorescente não foram observadas no local da lesão, não nos parece plausível concluir que as alterações descritas tenham ocorrido em função de algum tipo de efeito justácrino ou mesmo parácrino. Sugerimos que o efeito terapêutico dessas células ocorra por algum tipo de mecanismo telécrino.

AGRADECIMENTOS

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro. Aos Laboratórios de Histologia do Departamento de Biologia Geral, de Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV-BIOAGRO), ao Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária e ao Biotério da Educação Física da Universidade Federal de Viçosa e ao Laboratório de Biologia de Imunogenética da Universidade Federal de Minas Gerais pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams MB, Dominguez C, Pernold K, Reger R, Wiesenfeld-Hallin Z, Olson L, Prockop D. (2009). Multipotent mesenchymal stromal cells attenuate chronic inflammation and injury-induced sensitivity to mechanical stimuli in experimental spinal cord injury. *Restor Neurol Neurosci.*27(4):307-21.

Ankeny DP, Mctigue DM, and Jakeman, 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].(2011). Disponível em: http://www.asia-spinalinjury.org/elearning/ISNCSCI_Exam_Sheet_r4.pdf. Acessado em: 20 de Janeiro de 2013.

Augello A, Kurth TB, De Bari C. (2010). Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater* 20: 121–133.

Bagley RS, Harrington ML, Silver GM, Cambridge AJ, Connors RL, Moore MP. (1999). Exogenous spinal trauma: clinical assessment and initial management. *Vet. Neurology*, 21:1138-1143.

Bakondi B, Shimada IS, Perry A, Munoz JR, Ylostalo J, Howard AB, Gregory CA, Spees JL. (2009). CD133 Identifies a Human Bone Marrow Stem/Progenitor Cell Sub-population With a Repertoire of Secreted Factors That Protect Against Stroke. *Mol Ther* 17:1938–1947.

Bakshi A, Barshinger A, Swanger S, Madhvani V, Shumsky J, Neuhuber B, and Fischer I. (2006). Lumbar Puncture Delivery of Bone Marrow Stromal Cells in Spinal Cord Contusion: A Novel Method for Minimally Invasive Cell Transplantation. *Journal of Neurotrauma.* 23:55–65

Barry FP, Murphy JM. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 568–584.

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.

Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loores K, Green J, Dietrich WD. (1999). Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and

significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 16:851-863.

Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, Shannon CP, Plemel JR, Xie Y, Miller FD, Tetzlaff W. (2007). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J. Neurosci*. 27, 9545–9559.

Bignami A, Dahl D. (1994). Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury. Austin: Landes.

Blight AR. (2000). New drugs for spinal trauma. *American College of Veterinary Internal Medicine Forum*. 18:292-293.

Busch SA, Silver J. (2007). The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol*. 17, 120–127.

Carvalho, PH. Avaliação neurológica e histológica de lesão compressiva da medula espinhal de ratos wistar, tratados com células-tronco mesenquimais. (Dissertação). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.

Cho SR, Kim YR, Kang HS, Yim SH, Park CI, Min YH, Lee BH, Shin JC, Lim JB. (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, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. (2000). Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 11: 3001–3005.

Cizkova D, Rosocha J, Vanicky I, Jergová S, Cizek M. (2006). Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol. Neurobiol*. 26:1167-1180.

Cizkova D, Novotna I, Slovinska L, Vanicky I, Jergova S, Rosocha J, Radonak J. (2010). Repetitive intrathecal catheter delivery of bone marrow mesenchymal stromal cells improves functional recovery in a rat model of contusive spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. v. 7.

Coutts M, Keirstead HS. (2008). Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol* 209: 368–377.

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

Decimo I, Bifari F, Rodriguez FJ, Malpeli G, Dolci S, Lavarini V, Pretto S, Vasquez S, Sciancalepore M, Montalbano A, Berton V, Krampera M,

Fumagalli G. (2011). Nestin- and doublecortin-positive cells reside in adult spinal cord meninges and participate in injury-induced parenchymal reaction. *Stem cells*. 29:2062–2076.

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

Deng YB, Liu Y, Zhu WB, Bi XB, Wang YZ, Ye MH, and Zhou GQ. (2008). The co-transplantation of human bone marrow stromal cells and embryo olfactory ensheathing cells as a new approach to treat spinal cord injury in a rat model. *Cytotherapy* 10, 551–564.

Donnelly DJ, Popovich PG. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 209:378-388.

Escartin C, Bonvento G. (2008). Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. *Mol Neurobiol*. 38(3), 231-241.

Fawcett JW, Asher RA. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 49, 377–391.

Fitch MT, Silver J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp. Neurol*. 209:294–301.

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, Ueta M, Ide M, Mizushima T, Ogata H. (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.

Grayson W, Zhao F, Bunnell B, Ma T. (2007). Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358: 948–953.

Greco SJ, Zhou C, Ye JH, Rameshwar P. (2008). A method to generate human mesenchymal stem cell-derived neurons which express and are excited by multiple neurotransmitters. *Biol Proced Online* 10: 90–101.

Guest JD, Herrera L, Margitich I, Oliveria M, Marcillo A, Casas CE. (2008). Xenografts of expanded primate olfactory ensheathing glia support transient behavioral recovery that is independent of serotonergic or

corticospinal axonal regeneration in nude rats following spinal cord transection. *Exp. Neurol.* 212: 261–274.

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

Hsu YC, Lee DC, Chiu IM. (2007). Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors. *Cell Transplant.* 16:133–150.

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

Hyun JK, Kim H. (2010). Clinical and experimental advances in regeneration of spinal. *Journal of Tissue Engineering.* 1:1-20,

Jansen BJ, Gilissen C, Roelofs H, Schaap-Oziemlak A, Veltman JA, Raymakers RA, Jansen JH, Kögler G, Figdor CG, Torensma R, Adema GJ. (2010). Functional differences between mesenchymal stem cell populations are reflected by their transcriptome. *Stem Cells Dev* 19:481–490.

Karaoz E, Kabatas S, Duruksu G, Okçu A, Subasi C, Ay B, Musluman M, Civelek E. (2012). Reduction of lesion in injured rat spinal cord and partial functional recovery of motility after bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation. *Turk Neurosurg.* 22:207-17

Karp JM, Leng Teo GS. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* Mar 6;4(3):206-216.

Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, Bulte JW, Petrou P, Ben-Hur T, Abramsky O, Slavin S. (2010). Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives of Neurology* 67:1187–1194.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 24:1294–1301

Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H. (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.

Lianza S, Casalis ME, Greve JMD, Eichberg R. (2001). A lesão medular. In Lianza S.(Org.). Medicina de reabilitação. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.299-322.

Liu NK, Zhang YP, Titsworth WL, Jiang X, Han S, Lu PH, Shields CB, Xu XM.(2006). A novel role of phospholipase A2 in mediating spinal cord secondary injury. *Ann Neurol*. 59:606–19.

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.

Liu WL, Lee YH, Tsai SY, Hsu CY, Sun YY, Yang LY, Tsai SH, and Yang WC. (2008). Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia*. 56:1390–1400.

Meirelles LS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 20:419–427.

McDonald J, Sadowsky C.(2002).Spinal-cord injury. *The Lancet*. 359:417-425.

Ministério da Saúde (2012). Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_atencao_pessoa_lesao_medular.pdf. Acessado em 10 de Janeiro de 2013.

Monteiro, BS, Argôlo NMN, Del Carlo RJ. (2010). Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*.40:238-245.

Moreno-Manzano V, Rodriguez-Jimenez FJ, Garcia-Rosello M, Laínez S, Erceg S, Calvo MT, Ronaghi M, Lloret M, Planells-Cases R, Sánchez-Puelles JM, Stojkovic M.(2009). Activated Spinal Cord Ependymal Stem Cells Rescue Neurological Function. *Stem Cells*.27:733–743.

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.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY DATABASE. Disponível em: <http://www.uab.edu/medicine/sci/information-for-the-newly-injured/faqs-about-spinal-cord-injury-sci/what-is-a-spinal-cord-injury>. Acessado em 20 de Janeiro de 2013.

Neuhuber B, Timothy Himes B, Shumsky JS, Gallo G, Fischer I. (2005). Axon growth and recovery of function supported by human bone

marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Research* 1035: 73–85.

Neuhuber B, Swanger S, Howard L, Mackay A, Fischer I. (2008). Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Experimental Hematology*. 36:1176–1185.

Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Wu YP, Chen WS.(2012). Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *Chen Indian J Med Res* 135:287-96

Kishk NA, Gabr H, Hamdy S, Afifi L, Abokresha N, Mahmoud H, Wafaie A, Bilal D. (2010). Case Control Series of Intrathecal Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Therapy for Chronic. *Neurorehabil Neural Repair*. 24:702-708.

Nomura T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. (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.

Onose G, Anghelescu A, Muresano DF, Padure I, Haras MA, Chendreau CO, Onose LV, Mirea A, Ciurea AV, El Masri WS, Von Wild KR. (2009). A review of published reports on neuroprotection in spinal Cord injury. *Spinal Cord*.47:716-726.

Osaka M, Honmou O, Murakami T, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. (2010). Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Research* 1343: 226–235.

Park WB, Kim SY, Lee SH, Kim HW, Park JS, Hyun JK. (2010). The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats. *BMC Neurosci*.11:119-123,

Parr AM, Tator CH, Keating A. (2007). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplantation* 40:609–619.

Parr AM, Kulbatski I, Zahir T, Wang X, Yue C, Keating A, and Tator CH. (2008). Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. *Neuroscience*. 155:760–770.

Pearse DD, Sanchez AR, Pereira FC, Andrade CM, Puzis R, Pressman Y, Golden K, Kitay BM, Blits B, Wood PM, and Bunge MB. (2007). Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia*. 55:976–1000.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-147.

Poll D, Parekkadan B, Borel Rinkes IHM, Tilles AW, Yarmush ML. (2008). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs. *Cellular and Molecular Bioengineering* 1:42–50.

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

Quertainmont R, Cantinieaux D, Botman O, Sid S, Schoenen J, Franzen R. (2012). Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. *Plos One*. 7(6): e39500.

Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, Kim YJ, Jo JY, Yoon EJ, Choi HJ, Kwon E. (2011). Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans. *Stem Cells and Development*. 20:1297-1308.

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

Ronaghi M, Erceg S, Moreno-Manzano V, Stojkovic M. (2010). Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? *Stem Cells*. 28:93-99.

Rossi SL, Nistor G, Wyatt T, Yin HZ, Poole AJ, Weiss JH, Gardner MJ, Dijkstra S, Fischer DF, Keirstead HS. (2010). Histological and Functional Benefit Following Transplantation of Motor Neuron Progenitors to the Injured Rat Spinal Cord. *Plos One*. 5:1-15,

Roussos I, Rodriguez M, Villán D, Ariza A, Rodriguez L, García J. (2005). Development of a Rat Model of Spinal Cord Injury and Cellular Transplantation. *Transplantation Proceedings* 37:4127–4130.

Saberi H, Moshayedi P, Aghayan HR, Arjmand B, Hosseini SK, Emami-Razavi SH, Rahimi-Movaghar V, Raza M, and Firouzi M. (2008). Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: An interim report on safety considerations and possible outcomes. *Neurosci. Lett*. 443:46–50.

Sahni V. e Kessler J. A. (2010). Stem cell therapies for spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurol*. 6:363–372

Sauerzweig S, Munsch T, Lemann V, Reymann KG, Braun H. (2009). A population of serumdeprivation-induced bone marrow stem cells (SD-BMSC) expresses marker typical for embryonic and neural stem cells. *Experimental Cell Research* 315: 50–66.

Saunders L, Selassie A, Hill E, Nicholas J, Varma A, Lackland D, Patel S. (2009). Traumatic spinal cord injury mortality, 1981–1998. *J Trauma* 66:184–90.

Schultz SS. (2005) Adult stem cell application in spinal cord injury. *Curr Drug Targets* 6: 63–73.

Sobani ZA, Quadri SA, Enam A. (2010). Stem cells for spinal cord regeneration: current status. *Surgical Neurology International*. 1:93-107,

Sumida M, Fugimoto M, Tokwiro A, Tominaga T, Magara A, Uchida R. (2001). Early Rehabilitation Effect for Traumatic Spinal Cord Injury. *Academy of Physical Medicine and Rehabilitation*. 82:391-395.

Tarasenko YI, Gao J, Nie L, Johnson KM, Grady JJ, Hulsebosch CE, McAdoo DJ, Wu P. (2007). Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior. *Journal of Neuroscience Research* 85: 47–57.

Tetzlaff W, Okon EB, Karimi-Absolrezaee S, Hill CE, Sparling JS, Plemel JR, Plunet WT, Tsai EC. (2011). Baptiste, D.; Smithson, L. J.; Kawaja, M. D.; Fehlings, M. G.; Kwon, B. K. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 28: 1611-1682.

Tobias CA, Shumsky JS, Shibata M, Tuszynski MH, Fischer I, Tessler A, Murray M. (2003). Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration. *Experimental Neurology* 184: 97–113.

Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. (2011). Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 24: 59–64.

Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, Burian M, Hajek M, & Sykova E. (2006). Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, 23(9):1379-1391.

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

Wei LC, Shi M, Chen LW, Cao R, Zhang P, Chan YS. (2002). Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 9–17.

White RE, Yin FQ, Jakeman LB. (2008). TGF- α increases astrocyte invasion and promotes axonal growth into the lesion following spinal cord injury in mice. *Exp Neurol*. 214:10-24

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. (2004). Nestin expression: a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61:2510–2522.

Wong T, Gammon L, Liu L, Mellerio JE, Dopping-Hepenstal PJC, Pacy J, Elia G, Jeffery R, Leigh IM, Navsaria H, McGrath JA. (2008). Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 128:2179–2189

Wu S, Suzuki Y, Ejiri Y, Noda T, Bai H, Kitada M, Kataoka K, Ohta M, Chou H, Ide C. (2003). Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. *J Neurosci Res* ; 72: 343–351.

Xu R, Wu C, Tao Y, Yi J, Yang Y, Zhang X, Liu R. (2008). Nestin-positive cells in the spinal cord: a potential source of neural stem cells. *Int. J. Devl Neuroscience* 26: 813–820

Xu H, Miki K, Ishibashi S, Inoue J, Sun L, Endo S, Sekiya I, Muneta T, Inazawa J, Dezawa M, Mizusawa H. (2010). Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion. *J Neurosci Res* 88: 3598–3609.

Yoshihara H, Shumsky JS, Neuhuber B, Otsuka T, Fischer I, and Murray M. (2006). Combining motor training with transplantation of rat bone marrow stromal cells does not improve repair or recovery in rats with thoracic contusion injuries. *Brain Res.* 1119, 65–75.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick HM. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13:4279–4295.

Zuo J, Ferguson TA, Hernandez YJ, Stetler-Stevenson WG, Muir D. (1998). Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite-inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 18: 5203–5211.