



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

CELICE CORDEIRO DE SOUZA

EFEITOS DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA
MEDULA ÓSSEA APÓS LESÃO INCOMPLETA DA MEDULA ESPINHAL DE
RATOS ADULTOS

BELÉM-PARÁ

2017

CELICE CORDEIRO DE SOUZA

EFEITOS DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA
MEDULA ÓSSEA APÓS LESÃO INCOMPLETA DA MEDULA ESPINHAL DE
RATOS ADULTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para aquisição do Título de Doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal e co-orientação do Prof. Dr. Moisés Hamoy.

BELÉM-PARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Souza, Celice Cordeiro de

Efeitos do transplante autólogo de células monocelulares da medula óssea após lesão incompleta da medula espinhal de ratos adultos / Celice Cordeiro de Souza ; Orientador, Wallace Gomes Leal ; Co-orientador, Moisés Hamoy. - 2017.

73 f. : il.

Inclui bibliografia

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Medula espinhal – ferimentos e lesões. 2. Células – uso terapêutico. 3. Paresia. I. Leal, Wallace Gomes, orientador. II. Hamoy, Moisés, co-orientador. III. Título.

CDD – 22 ed. 611.82

CELICE CORDEIRO DE SOUZA

EFEITOS DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA
MEDULA ÓSSEA APÓS LESÃO INCOMPLETA DA MEDULA ESPINHAL DE
RATOS ADULTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para aquisição do Título de Doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal e co-orientação do Prof. Dr. Moisés Hamoy.

Aprovação: 30 de março de 2017

BANCA JULGADORA DE DEFESA

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal (ICB-UFPA) – Orientador e Presidente de Banca

Prof. Dr. Nelson Elias Abrahão da Penha (CESUPA) – Membro Titular

Prof. Dra. Vânia Castro Corrêa (ICB-UFPA) – Membro Titular

Prof. Dra. Rosana Telma Lopes Afonso (CESUPA) – Membro Titular

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me trouxe até aqui e que é verdadeiramente o sentido de tudo. De nada vale o existir se não for para ofertar a Ele.

A meus pais, Francisco e Domingas, que são meus principais apoiadores. Desde sempre, me criaram para que eu tivesse a instrução e a educação necessárias para eu ser uma pessoa que fizesse a diferença no meu meio. Não tenho palavras para agradecer o exemplo que me dão, por cuidarem de mim e por se doarem, sem esperar nada em troca. Vocês são os principais responsáveis pelo fim dessa história chamada doutorado.

À minha família. Irmã, cunhado, tio e tias, primos! Obrigada pela presença real em minha vida e me motivarem a ir além.

Ao meu namorado Lucas Bergh, por ser o parceiro consolador e motivador há quatro anos. Obrigada por olhar na mesma direção ao meu lado!

À minha família estendida de amigos e irmãos da vida, aqui representados por duas pessoas: Rosana Lopes Afonso e Soanne Chyara Soares. São incomparáveis e presentes, irmãos que me trazem alegria e confiança.

À minha comunidade, Casa da Juventude Comunidade Católica (CAJU), por ser a minha escola da fé, casa que abriga, acolhe, consola, ensina e me chama a viver uma Alegria que nunca passará.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, pela oportunidade e confiança que me foi dada em 2009, ainda no mestrado e que se prolongou no doutorado. Obrigada pela paciência e pelo testemunho de ousadia em ser um cientista amazônico que trabalha na Amazônia;

Ao Laboratório de Fertilização Animal, chefiado pelo Prof. Dr. Otávio Ohashi, e ao Laboratório de Neuroendocrinologia, chefiado pelo prof. Anderson Herculano, pela ajuda material em momentos de dificuldade;

À responsável técnica do Laboratório de Neuroquímica (chefeado pelo prof. José Luiz), Neidiane Ramos, e a Jorge Rissino do Laboratório de Citogenética pela ajuda no preparo dos reagentes necessários à extração das células mononucleares.

A todos os membros do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE). Aos professores, alunos de doutorado e mestrado, além dos alunos de Iniciação Científica. Em especial, aos imprescindíveis Marcelo Cardoso, Arthur Sampaio, Mário Santos, Michelle Castro, Rosana Lopes Afonso e Elane Magno. Obrigada a TODOS!

Ao apoio financeiro do órgão de fomento, CNPq, sem o qual não haveria material necessário aos experimentos desse estudo.

Ao Centro Universitário do Pará (CESUPA), por todo o apoio e compreensão. Tenho muito orgulho de trabalhar em uma das maiores instituições de ensino da Amazônia, que cuida de seus professores e colaboradores. Muito obrigada!

“A fé e a razão constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade. “

São João Paulo II

RESUMO

A lesão da medula espinhal (LME) causa perda permanente da função neurológica abaixo do nível de lesão, gerando consequências físicas, sociais e psicológicas nos pacientes. A fisiopatologia da LME envolve processos complexos, como hemorragia, excitotoxicidade e inflamação, geradas principalmente pelas células microgлияis. Apesar do avançado conhecimento sobre os mecanismos patológicos, ainda não existem estratégias terapêuticas eficazes e aprovadas para o tratamento das lesões e suas consequências sem que tenham efeitos adversos graves. A terapia celular pode representar uma boa estratégia terapêutica por demonstrar bons resultados na modulação do ambiente inflamatório da lesão e por prováveis mecanismos de diferenciação. No presente estudo, investigamos a ação das células mononucleares da medula óssea (CMMO) em lesões incompletas (hemissecção à direita da medula espinhal, segmento T8-T9) após 42 dias de lesão (lesão crônica). As células eram do próprio animal lesionado (transplante autólogo) e o transplante foi intramedular, ou seja, as células eram inseridas próximas ao local da lesão. No presente estudo, investigaram-se os efeitos funcionais do transplante por meio da escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan), que permite graduar a função motora das patas posteriores dos animais. Investigou-se também os efeitos anti-inflamatórios das CMMO. Foram utilizadas técnicas histológicas e imunohistoquímicas usando a coloração de Violeta de Cresila e os anticorpos anti-ED-1 (marcador de micróglia/macrófagos ativados) e anti-GFAP (marcador de astrócitos fibrilares). Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas. Para análise quantitativa, o número de astrócitos e macrófagos/micróglia ativados por campo foram contados usando microscópio binocular com gradícula de contagem ($0,0625\text{mm}^2$) em objetiva de 40x. As médias das contagens e os desvios-padrão obtidos foram plotados em coordenadas cartesianas. A contagem se deu da seguinte forma: no lado direito da medula espinhal (lado com lesão) e três campos por região medular (funículo ventral - FV, funículo dorsal - FD, funículo lateral - FL, corno dorsal - CD, corno ventral - CV e substância cinzenta intermediária-SCI), totalizando 18 campos de contagem por secção. O tratamento com CMMO não foi eficaz para melhorar a função motora dos animais lesionados quando comparamos os animais tratados e não tratados (médias e desvios-padrão dos grupos: falso operado, $n=4$, 21 ± 0 ; controle, $n=4$, $13,57\pm 3,88$; tratado, $n=5$, $15,07\pm 3,46$). Na análise qualitativa por meio da coloração de Violeta de Cresila, os animais tratados apresentaram melhor preservação tecidual quando comparados com os animais não tratados. Na análise quantitativa da ativação microglial, observamos que o tratamento com as CMMO reduziu a ativação dessas células inflamatórias (controle: $19,52\pm 7,79$; tratados: $10,04\pm 2,37$), porém não reduziu significativamente a ativação dos astrócitos (médias dos grupos: controle $17,74\pm 2,757$; tratados $14,46\pm 5,283$). Os resultados sugerem que mais estudos são necessários para chegar-se a uma estratégia eficaz para os pacientes com LME. Um possível tratamento combinado com outras estratégias pode vir a ser promissor para a funcionalidade dos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: Lesão medular, Terapia Celular, Escala BBB, Hemiparesia

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) causes permanent loss of neurological function below the level of injury, generating social and psychological physical consequences in patients. The pathophysiology of SCI involves complex processes, such as hemorrhage, excitotoxicity and inflammation, mainly generated by microglial cells. Despite advanced knowledge of pathological mechanisms, effective and approved therapeutic strategies for the treatment of lesions and their consequences are still lacking without serious adverse effects. Cell therapy may represent a good therapeutic strategy because it demonstrates good results in the modulation of the inflammatory environment of the lesion and by probable mechanisms of differentiation. In the present study, we investigated the action of bone marrow mononuclear cells (BMMC) in incomplete lesions (hemisection to the right of the spinal cord, T8-T9 segment) after 42 days of injury (chronic lesion). The cells were from the injured animal itself (autologous transplantation) and the transplantation was intramedullary, i.e. the cells were inserted near the site of the lesion. In the present study, the functional effects of transplantation were investigated through the BBB scale (Basso, Beattie and Bresnahan), which allows the motor function of the hind legs of the animals to be graded. The anti-inflammatory effects of BMMC were also investigated. Histological and immunohistochemical techniques using Cresil Violet staining and anti-ED-1 (microglial marker / activated macrophages) and anti-GFAP (fibrillar astrocyte marker) antibodies were used. Qualitative and quantitative analyzes were performed. For quantitative analysis, the number of field activated astrocytes and macrophages / microglia were counted using binocular microscope with counting gradient (0.0625mm²) in a 40x objective. The counting averages and the standard deviations obtained were plotted in Cartesian coordinates. The counting was as follows: on the right side of the spinal cord (lesion side) and three fields per medullary region (ventral funiculus - FV, dorsal funiculus - FD, lateral funiculus - FL, dorsal horn - CD, ventral horn - CV and intermediate gray matter-SCI), totaling 18 counting fields per section. Treatment with BMMC was not effective in improving the motor function of the injured animals when we compared the treated and untreated animals (means and standard deviations of the groups: false operated, n = 4, 21 ± 0, control, n = 4, 13,57 ± 3.88, treated, n = 5, 15.07 ± 3.46). In the qualitative analysis by means of the staining of Cresil Violet, treated animals presented better tissue preservation when compared to the untreated animals. In the quantitative analysis of microglial activation, we observed that treatment with BMMC reduced the activation of these inflammatory cells (control: 19.52 ± 7.79, treated: 10.04 ± 2.37), but did not significantly reduce the activation of the astrocytes (Mean of the groups: control 17.74 ± 2.757, treated 14.46 ± 5.283). The results suggest that further studies are needed to come up with an effective strategy for patients with SCI. A possible combined treatment with other strategies may turn out to be promising for patients' functionality.

KEY WORDS: Spinal Cord Injury, Cell Therapy, BBB Scale, Hemiparesis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 LESÃO TRAUMÁTICA DA MEDULA ESPINHAL	12
1,2 FISIOPATOLOGIA DA LME	13
1.2.1 Hemorragia	15
1.2.2 Excitotoxicidade	16
1.2.3 Morte Celular	18
1.2.4 Reação Imune e Inflamação	20
1.3 LESÃO DE SUBSTÂNCIA BRANCA	24
1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LME	25
1.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL	26
1.6 TERAPIA CELULAR NA LME	28
1.7 HIPOTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL	32
1.8 OBJETIVOS	33
1.8.1. Objetivo geral	33
1.8.2. Objetivos específicos	33
2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 MODELO EXPERIMENTAL DE LME E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	34
2.2 EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	36
2.3 ANÁLISE FUNCIONAL	37
2.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA	40

2.5 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS	42
3. RESULTADOS	44
3.1 HEMISSECÇÃO FOI EFICAZ COMO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR INCOMPLETA	44
3.2 TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NÃO FOI EFICAZ PARA MELHORAR A FUNÇÃO MOTORA DOS ANIMAIS QUE SOFRERAM LESÃO MEDULAR INCOMPLETA CRÔNICA	44
3.3 TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DIMINUIU INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA MEDULA ESPINHAL APÓS LESÃO INCOMPLETA	48
3.4 TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DIMINUIU ATIVAÇÃO DE CÉLULAS MICROGLIAIS NA SUBSTÂNCIA BRANCA DA MEDULA ESPINHAL APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA CRÔNICA	50
3.5 TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NÃO ALTEROU A PROLIFERAÇÃO DE ASTRÓCITOS NA SUBSTÂNCIA BRANCA DA MEDULA ESPINHAL APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA CRÔNICA	53
4. DISCUSSÃO	56
4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	56
4.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL	57
4.3 FUNÇÃO MOTORA APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA	58

4.4 ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA	59
4.5 ASTROCITOSE APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA	60
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63

1.INTRODUÇÃO

1.1.LESÃO TRAUMÁTICA DA MEDULA ESPINHAL

As lesões da medula espinhal (LME) causam perda permanente de função neurológica abaixo da lesão, acarretando graves consequências físicas, sociais e psicológicas aos pacientes (YANG, et al., 2006). Os traumatismos, principais mecanismos de LME, são as causas mais comuns de morte e de incapacidade física em indivíduos jovens, além de contribuir para os altos custos do sistema público de saúde (PEDRAM, REZA, REZA, VACCARO, & VAFA, 2010). A incidência de LME em países desenvolvidos varia de 35 casos por milhão de habitantes (Canadá) a 40 casos/milhão (nos Estados Unidos, país de maior incidência nesse tipo de lesão) (PIROUZMAND, 2010). Em relação às causas, cerca de 57% das LME são causados por acidentes automobilísticos, 21,2% por quedas e 9,5% em atividades recreativas (como mergulhos em águas rasas), com média de idade de 33 anos (PIROUZMAND, 2010). Em dados mais recentes, observou-se que os acidentes automobilísticos são as causas mais comuns em pessoas com menos de 45 anos e as quedas são as mais comuns em pessoas com mais de 45 anos. Ferimentos por arma de fogo, acidentes de motocicleta e mergulhos em águas rasas são mais comuns em homens que em mulheres (CHEN, TANG, VOGEL, & DEVIVO, 2013).

No Brasil, no ano de 1997, foram atendidos em hospitais ligados ao SUS (Sistema Único de Saúde), 6388 pacientes com fraturas de coluna vertebral, sendo que mais de 50% dessas fraturas estavam localizadas nos segmentos cervical e torácico (Ministério da Saúde, 2001). Nesse mesmo ano, a Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação do Aparelho Locomotor (referência nacional em recuperação funcional de lesões neurológicas) atendeu 293 pacientes com lesões medulares: 42,2% deles foram vítimas de acidentes de trânsito e 24%, vítimas de lesões por armas de fogo.

Em relação à faixa etária, 53,7% tinha idade entre 10 e 29 anos (Ministério da Saúde, 2001). Em 2003, no mesmo hospital de referência, foram atendidos 1.235 pacientes, compostos, em sua maioria, por indivíduos do sexo masculino (74%), na faixa etária de 20 a 39 anos (56%), que sofreram acidentes automobilísticos (38,7%) ou vítimas de violência (26,2%). Já em relação à gravidade da lesão, 60,8% dos pacientes se tornaram paraplégicos e 39,2% tetraplégicos (PEREIRA & ARAUJO, 2006).

Esses dados são corroborados com dados um pouco mais atuais, confirmando a prevalência de traumas em pacientes do sexo masculino (86%) e jovens (mais de 40% dos acidentes aconteceu em pessoas com menos de 30 anos). Em relação às causas, verificou-se a prevalência de traumas por acidente automobilístico (50%). A maioria dos traumas afetou os segmentos tóraco-lombares da medula espinhal (72,5%) (FERRAZ DE CAMPOS, et al., 2008).

1.2. FISIOPATOLOGIA DA LME

As lesões traumáticas na medula espinhal podem ocorrer por mecanismos como compressão, contusão ou laceração da coluna vertebral. Esse trauma pode lesionar corpos neuronais e axônios responsáveis por comandos motores, estímulos sensoriais e autonômicos no sítio de lesão e segmentos medulares abaixo da lesão primária. Dependendo do grau de severidade, as disfunções dos pacientes podem englobar paralisia, perda de sensibilidade, dor neuropática, disfunção intestinal e vesical (MOTHE & TATOR, 2013).

A lesão primária, que consiste na lesão ocorrida durante o trauma mecânico, gera diversos mecanismos, como hemorragia, edema, necrose e destruição do tecido. Logo após a lesão primária, eventos secundários iniciam-se, agravando o edema, gerando constrição dos vasos sanguíneos, vasoespasmo, inflamação,

excitotoxicidade, peroxidação lipídica, produção de radicais livres, isquemia, morte celular por apoptose, desmielinização e distúrbios eletrolíticos (MOTHE & TATOR, 2013). Apesar dessas reações serem fisiológicas, demonstrou-se que esses acontecimentos exacerbam a lesão principal e podem dificultar/impedir a recuperação funcional dos pacientes (CADOTTE & FEHLINGS, 2010).

Após os mecanismos de lesão primária e secundária, há perda significativa de tecido nervoso, gerando uma cavidade no local da lesão medular, que aumenta de acordo com o tempo, agravando a lesão tecidual (MOTHE & TATOR, 2013). Esses acontecimentos serão explicados brevemente a seguir e estão resumidos na Figura 1.

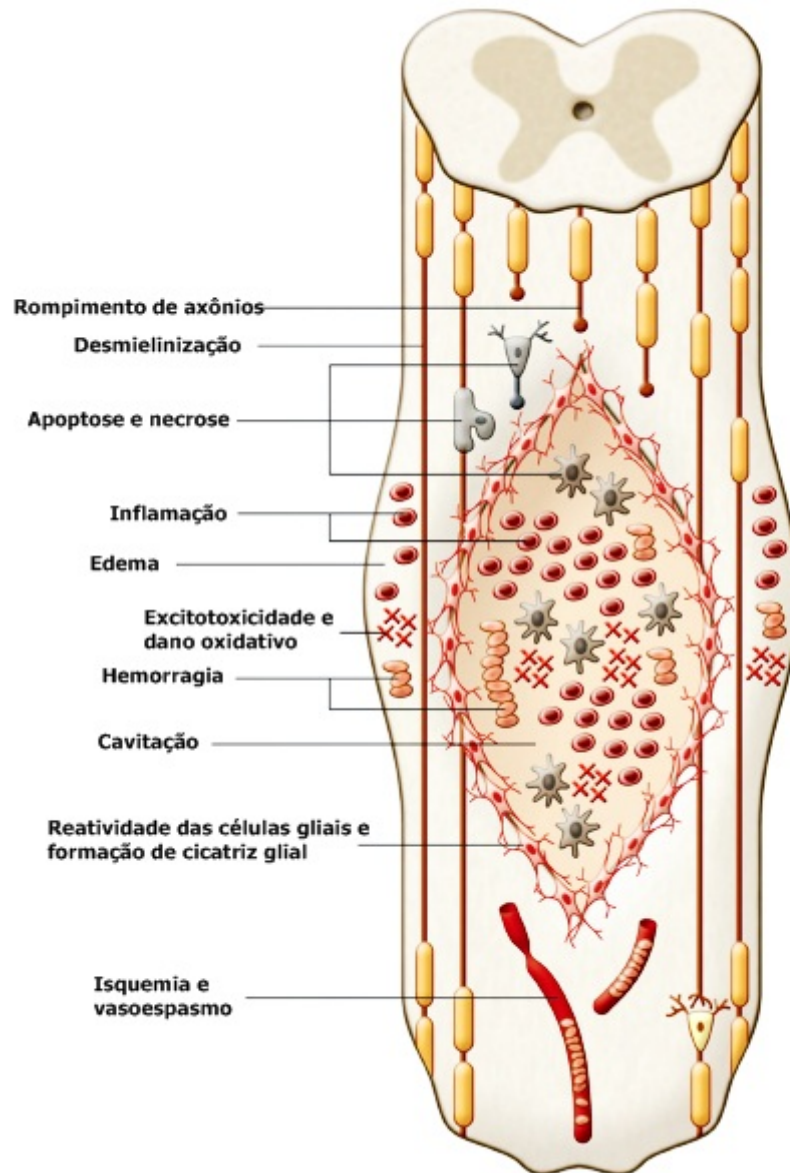


Figura 1 - Desenho esquemático representativo dos mecanismos envolvidos na lesão primária e na lesão secundária da medula espinhal. Esquema adaptado de (Mothe & Tator, 2012).

1.2.1. Hemorragia

Independente da causa do trauma primário, a hemorragia é o mecanismo imediato de lesão secundária. A microvasculatura do tecido nervoso é rompida, o que causa petéquias hemorrágicas e trombose intravascular. Além disso, o trauma gera

espasmos dos vasos sanguíneos sadios e edema no local da lesão, o que provoca hipoperfusão e isquemia (KOYANAGI, TATOR, & THERIAULT, 1993). Quando a lesão é incompleta, os vasos mais calibrosos, como a artéria espinhal anterior, não são afetados. Em lesões mais graves, os grandes vasos da medula são também lesionados, o que induz agravamento das manifestações vasculares (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004).

1.2.2. **Excitotoxicidade**

Além da hemorragia, outro processo que gera mais lesão celular é a excitotoxicidade, que consiste na resposta das células nervosas à lesão, bloqueando os potenciais de ação (HULSEBOSCH, 2002). Além disso, há mudanças eletrolíticas significativas, como o aumento das concentrações intracelulares de sódio, das concentrações extracelulares de potássio e das concentrações intracelulares de cálcio, estas últimas atingindo níveis tóxicos às células. Esses eventos agudos são responsáveis pela perda da função normal do tecido na fase inicial, chamada de choque medular, que dura aproximadamente 24 horas (HULSEBOSCH, 2002).

Nos primeiros quinze minutos após o trauma, as concentrações extracelulares de glutamato e outros aminoácidos excitatórios atingem concentrações tóxicas (de seis a oito vezes a concentração normal). Isso acontece, basicamente, por causa da lise celular causada pelo impacto mecânico (HULSEBOSCH, 2002). O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC (Sistema Nervoso Central), agindo tanto nos receptores ionotrópicos quanto nos metabotrópicos. Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos (ou seja, receptores responsáveis pelo transporte de íons) incluem o N-metil-D-aspartato (NMDA) e o alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxapropinato (AMPA)/cainato, que são responsáveis, particularmente, pelo

transporte de cálcio e sódio. Já os receptores metabotrópicos se ligam e ativam as proteínas G, que agem como mensageiros intracelulares secundários na mediação de várias funções celulares (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004).

O processo da excitotoxicidade consiste basicamente no efeito deletério que o excesso do estímulo de glutamato aos seus receptores exerce nas células. A ativação desses receptores, principalmente os ionotrópicos, permite que sódio e cálcio do meio extracelular entrem em grandes quantidades para o meio intracelular (devido ao gradiente de concentração), além de liberar o cálcio intracelular estocado em compartimentos citoplasmáticos (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004). Essas concentrações altas de cálcio no citosol e na mitocôndria desencadeiam alguns processos dependentes de cálcio e que alteram, invariavelmente, o metabolismo celular (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004). Esses processos incluem a ativação de enzimas líticas, como as calpaínas, a fosfolipase A2 e a lipoxigenase; a geração de radicais livres e a desregulação da fosforilação oxidativa mitocondrial, gerando a morte por apoptose das células nervosas (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004).

Em relação ao íon sódio, a falta de regulação influencia também, de forma particular, o aumento da lesão dos axônios e de componentes gliais da substância branca. O aumento da concentração intracelular de sódio é provocado pela ativação glutamatérgica dos receptores NMDA, AMPA e cainato e pela ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004).

Normalmente, a propagação do potencial de ação das células nervosas é produzida pelo influxo de sódio através da ativação dos canais de sódio dependentes

de voltagem. Em situações patológicas, a despolarização intensa e a perda de adenosina tri-fostato (ATP) – para mover o sódio de volta ao meio extracelular – levam a um acúmulo tóxico de sódio (e água) no axônio (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004).

O glutamato também pode ser tóxico em uma fase mais crônica da degeneração da substância branca, processo que envolve a secreção de glutamato através do transporte desse neurotransmissor pelos canais dependentes de sódio, com subsequente ativação dos receptores AMPA e morte de oligodendrócitos (FAROOQUI, ONG, & HORROCKS, 2008).

A hiperativação dos receptores AMPA é um dos principais mecanismos para a lesão da substância branca na LAME. Essa manifestação, causada pelo excesso de glutamato no espaço extra-celular, causa dano funcional irreversível. Os aminoácidos excitatórios são tóxicos principalmente as regiões dorsais da substância branca (LI & STYS, 2000).

1.2.3. Morte Celular

A morte celular por apoptose não fica limitada ao local do impacto, nem no momento imediato pós-lesão. Embora haja intensa apoptose glial e neuronal, tanto na substância cinzenta quanto na branca, nas primeiras 24 horas após LAME, esse mecanismo de morte celular, principalmente de oligodendrócitos, persiste por vários dias, mesmo em locais distantes do centro de lesão. Como a apoptose é um processo relativamente rápido, que dura poucas horas, a apoptose crônica se reflete em um grande número de células mortas, principalmente oligodendrócitos (LIU, et al., 1997).

De forma geral, há dois meios de morte celular: a necrose e a morte celular programada, conhecida como apoptose. A morte necrótica envolve edema celular, o rompimento de organelas, além da lise da membrana e secreção de conteúdo intracelular que pode aumentar a reação inflamatória local (SYNTICHAKI & TAVERNARAKIS, 2003). Por outro lado, a morte celular programada envolve o enrugamento celular, organelas citoplasmáticas intactas e a fragmentação celular em corpos apoptóticos, que são, em seguida, fagocitados por macrófagos, sem gerar reação inflamatória muito intensa. Embora a necrose e a apoptose sejam descrições morfológicas de morte celular, elas ocorrem por diferentes vias. A necrose acontece quando um estímulo ou lesão severa provoca alteração nos mecanismos homeostáticos, levando ao dano da membrana e das organelas, perda de produção de ATP, além do edema passivo e consequente destruição da célula. A apoptose requer participação ativa da célula e pode ser considerada, por analogia, a um suicídio celular, iniciado por estímulos extrínsecos e intrínsecos que desencadeiam uma cascata de mecanismos intracelulares. Esses mecanismos levam a ativação de enzimas, chamadas caspases, que clivam proteínas nucleares e do citoesqueleto, causando a decomposição da célula (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004).

Enquanto que a necrose é caracterizada pela perda de ATP e falha energética da célula, o processo apoptótico depende de ATP e requer a síntese de proteínas para o completo processo. O fato é que ambos os tipos de morte celular acontecem após LAME. São desencadeados pelos mesmos mecanismos, como a isquemia, o estresse oxidativo e a excitotoxicidade, porém, quanto mais severa a lesão, maior o número de células que morrem por necrose. É evidente que evitar a morte por necrose é quase impossível, já que o trauma provoca uma lesão celular abundante. Porém, as células

próximas a área de lesão, que não foram diretamente atingidas pelo impacto primário, estão susceptíveis aos eventos secundários que provocam a morte por apoptose, o que pode representar uma boa estratégia terapêutica em lesões experimentais (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004).

1.2.4. Reação Imune e Inflamação

O papel do sistema imune e da neuroinflamação é um tanto controverso. Efeitos benéficos e maléficos da micróglia/macrófagos, linfócitos, anticorpos e citocinas têm sido relatados (DONNELLY & POPOVICH, 2007) (GOMES-LEAL W. , 2012). O sistema imune pode ser dividido, de maneira geral, em dois tipos: sistema imune inato, através de células como neutrófilos, monócitos e as células dendríticas, que promovem resposta imediata contra infecções ou outros estímulos inflamatórios e ajudam na ativação e no recrutamento das células do sistema imune adaptativo, como os linfócitos T e B. Essa transição se dá através de complexas interações envolvendo apresentação de antígenos e a secreção de vários mediadores inflamatórios, como as citocinas e as quimiocinas (ANKENY & POPOVICH, 2009). Uma vez que os linfócitos são apresentados e reconhecem os antígenos, eles se proliferam, gerando grande número de “células-filhas” ou clones específicos para os antígenos combatidos (chamado de seleção clonal ou expansão clonal). Alguns clones permanecem no tecido por um tempo indefinido, gerando memória sobre tal antígeno/estímulo, o que acontece, por exemplo, no caso das vacinações (ANKENY & POPOVICH, 2009).

A inflamação é uma resposta de defesa e reparativa de tecidos lesionados. Nas LME, a resposta inflamatória e imunológica é diferente do que ocorre nos outros tecidos, tanto de forma quantitativa, quanto qualitativa. Após a lesão, o tecido medular é rapidamente infiltrado por neutrófilos sanguíneos (cerca de duas vezes mais do que

em lesões cerebrais), os quais secretam enzimas líticas e citocinas, que podem danificar as células locais e ainda recrutar outras células inflamatórias (SCHNELL, FEARN, KLASSEN, SCHWAB, & PERRY, 1999). Os monócitos/macrófagos são também recrutados, assim como a micróglia/macrófagos residentes, que têm a função primordial e fagocitar o tecido lesionado. Essas células produzem algumas citocinas, como o TNF- α , interleucinas e interferons, que fazem a mediação da resposta inflamatória do sistema imune adaptativo, contribuindo para o aumento da lesão (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004).

Os neutrófilos e macrófagos ativados durante a LAME causam toxicidade neuronal e glial. Os neurônios e as células da glia, em situações normais, sintetizam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), como parte da comunicação intercelular. No entanto, quando os níveis dessas citocinas estão permanentemente elevados, há morte de neurônios e oligodendrócitos (DONNELLY & POPOVICH, 2007). Os neutrófilos e macrófagos ativados também produzem enzimas neurotóxicas. A fosfolipase A2, uma enzima essencial à síntese de eicosanóides, é expressa por células microgliais, neurônios e oligodendrócitos. Tanto os eicosanóides quanto o ácido aracdônico são neurotóxicos porque promovem a cicloxigenase e a síntese de radicais livres, além de aumentar a permeabilidade vascular e o influxo de leucócitos. As enzimas que degradam a matriz extracelular (como as metaloproteases) são também produzidas por essas células (DONNELLY & POPOVICH, 2007).

Os neutrófilos exercem papel importante no fenômeno de lesão por isquemia-reperfusão, através da síntese e lançamento de vários mediadores inflamatórios, incluindo a elastase neutrofílica e radicais livres de oxigênio, ambos capazes de causar dano às células endoteliais. O bloqueio de leucócitos inibe o acúmulo de neutrófilos e aumenta os níveis de citocinas que irão ativar os neutrófilos, assim como

aumentar a gravidade de déficits motores após lesões medulares, o que mostra que os neutrófilos também podem ser benéficos em casos de LAME (HIROSE, et al., 2000).

Por outro lado, os macrófagos do SNC podem ter, também, papel benéfico durante as lesões. Em situações normais, a micróglia dá suporte trófico aos neurônios e as outras células da glia (MATUTE, 2010). Em situações patológicas, a micróglia ativada/macrófagos, juntamente com os monócitos/macrófagos derivados do sangue secretam citocinas pró-inflamatórias (HIROSE, et al., 2000). No entanto, estas células também sintetizam e secretam citocinas neuroprotetoras, incluindo TGF- β 1 (*transforming growth factor beta 1* – fator de transformação do crescimento), que protege neurônios e oligodendrócitos; e ainda NGF (*neural growth factor*- fator de crescimento neural), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor* – fator neurotrófico derivado de encéfalo) e NT-3 (DONNELLY & POPOVICH, 2007).

A ativação dos linfócitos também possui efeitos duplos na inflamação do SNC. Os linfócitos, tanto T quanto B possuem potencial patológico de reagir aos antígenos neurais, principalmente reconhecendo e reagindo a proteínas de mielina (principalmente MBP – *myelin basic protein* – proteína básica de mielina) (VON BUDINGEN, et al., 2001). Essa resposta auto-imune amplifica as funções efetoras dos macrófagos (de fagocitose), resultando em lesão da barreira hemato-encefálica (BHE) e toxicidade de oligodendrócitos e neurônios. Isso resulta em aumento do edema, lesão axonal e perda de função (DONNELLY & POPOVICH, 2007; VON BUDINGEN, et al., 2001).

Em oposição, os linfócitos podem ser elementos importantes e necessários para o reparo neural. Assim como os macrófagos/micróglia, as células T e B secretam a neurotrofina BDNF (HAUBEN & SCHWARTZ, 2003). Alguns estudos mostram que

imunizações (vacinas) com MBP podem ser neuroprotetoras, já que as células T específicas de MBP expressam neurotrofinas e antitrombina III (HAUBEN & SCHWARTZ, 2003). As células B também sintetizam auto-anticorpos específicos para proteínas mielínicas, que podem promover regeneração axonal e melhorar a função motora em LAME (DONNELLY & POPOVICH, 2007).

A reação astrocitária às lesões, chamada de astrogliose, faz com que essas células deixem seu estado de repouso e se tornem ativadas, tornando-se hipertrofiadas, com seus filamentos expressando proteínas como nestina, vimentina e proteína de glia fibrilar (GFAP), além da ativação da proliferação celular (GOMES-LEAL, CORKILL, FREIRE, PICANÇO-DINIZ, & PERRY, 2004). Durante a astrogliose, os astrócitos reativos continuam se dividindo e migram para a área de lesão, formando a cicatriz glial, e lançam uma série de fatores mediadores da resposta inflamatória tecidual (BUFFO, ROLANDO, & CERUTI, 2010). É evidente que o conhecimento da dinâmica da resposta dos astrócitos às lesões nervosas é essencial para o estudo da neuropatologia e para a avaliação dos danos neurais. Sendo assim, a astrogliose pode ser um importante alvo terapêutico para a regeneração da ME após lesão (BUFFO, ROLANDO, & CERUTI, 2010).

Além do número de astrócitos aumentar após situação patológica, os astrócitos passam por mudanças na sua morfologia – corpos celulares hipertróficos, com ramificações mais curtas e espessas, quando comparados com astrócitos em repouso (corpo celular menor e ramificações mais prolongadas (GOMES-LEAL, CORKILL, FREIRE, PICANÇO-DINIZ, & PERRY, 2004).

1.3. LESÃO DE SUBSTÂNCIA BRANCA

Como foi observado, as repercussões funcionais da lesão medular são causadas pela lesão primária associada a eventos secundários. Na substância branca, podemos apontar o rompimento de axônios, a morte de oligodendrócitos e a desmielinização dos tratos axonais como eventos importantes para a disfunção após lesões medulares (KOZLOWSKI, ROSICKA, LIU, YUNG, & TETZLAFF, 2014).

Em relação à bainha de mielina, esta é essencial para a condução dos sinais nervosos pelos axônios. Durante a lesão primária, há perda da mielina e subsequente desmielinização crônica, que contribuem para a perda de função sensório-motora, além de prejudicarem uma provável recuperação após lesões medulares. Muitos axônios que não são afetados pela lesão primária acabam perdendo sua função devido a degradação da bainha de mielina resultante da morte dos oligodendrócitos. (KOZLOWSKI, ROSICKA, LIU, YUNG, & TETZLAFF, 2014).

O estudo de Ek e colaboradores mostra a evolução temporal de uma lesão medular por impacto na substância branca da medula espinhal. Quinze minutos após a lesão primária, o dano tecidual e a hemorragia estão limitados à substância cinzenta central da medula. O dano a substância branca é pequeno (EK, et al., 2010).

Um dia após, a lesão já se expande para a substância branca adjacente à substância cinzenta. Após uma semana, macrófagos estão presentes na área de lesão e há evidências de limpeza do tecido lesionado. Após quatro semanas, a limpeza do local da lesão já está bem avançada, com a formação de uma grande cavidade no centro da medula espinhal, com uma fina camada de substância branca próxima a superfície pial. Após dez semanas, não há mais expansão da cavidade cística e poucos macrófagos restam na área de lesão. Na região rostral à lesão

medular, há maior dano na região medial da coluna dorsal da substância branca. Porém, nas áreas caudais à lesão, não há perda axonal na região medial da coluna dorsal, mas sim nas partes ventrais da coluna (EK, et al., 2010).

Observa-se que, portanto, o dano a qualquer componente da substância branca, seja o axônio ou a bainha de mielina, interrompe a transmissão nervosa normal. Além disso, ambos os componentes são susceptíveis aos eventos secundários à lesão primária, principalmente a hipóxia/isquemia pós-lesão e a excitotoxicidade, agravando ainda mais a função e impedindo recuperação sensório-motora mais efetiva (WASSERMAN & SCHLICHTER, 2008).

1.4. MODELOS EXPERIMENTAIS DE LME

O uso de modelos animais é essencial para o desenvolvimento de terapias experimentais que são desenvolvidas para tratamento de pacientes com lesões medulares. Animais como gatos, cães, ratos, camundongos e primatas não humanos são usados atualmente para mimetizar lesões medulares que podem acontecer com seres humanos. Os modelos experimentais com ratos são os mais comuns, por conta do custo, acessibilidade, facilidade em tratá-los, além da existência de técnicas de análises funcionais bem estabelecidas e confiáveis (SILVA, SOUSA, REIS, & SALGADO, 2013).

Nesses modelos experimentais, três tipos de lesão medular são mais comuns: transecção, contusão e compressão. Dependendo dos objetivos da pesquisa, opta-se por um modelo. Todos possuem vantagens e desvantagens (SILVA, SOUSA, REIS, & SALGADO, 2013). O modelo utilizado na presente pesquisa foi a hemissecção à direita. A transecção completa consiste em abertura da dura-máter e o corte da

medula espinhal por um instrumento pérfuro-cortante. Já a hemissecção “poupa” um dos lados da medula espinhal (SILVA, SOUSA, REIS, & SALGADO, 2013).

A hemissecção é um modelo experimental de lesão medular parcial. Esse modelo mimetiza, de forma eficaz, alguns traumas penetrantes que podem ocorrer em humanos, como ferimentos por arma de fogo ou arma branca, que não lesionam totalmente a medula espinhal. Também é um modelo experimental que permite o estudo de vias ou tratos específicos, regeneração axonal e sobrevivência celular. Além disso, não requer aparelho específico para realização da lesão e nem cuidados pós-operatórios tão extensos. Funcionalmente, os animais lesionados apresentam plegia na pata ipsilateral à lesão nervosa e disfunção sensorial (alodínia térmica e mecânica). Esse modelo também permite que a função vesical e intestinal seja poupada parcialmente, o que resulta em cuidados pós-operatórios menos intensos e aumento da sobrevivência dos animais (SILVA, SOUSA, REIS, & SALGADO, 2013; MILLS, HAINS, JOHNSON, & HULSEBOSCH, 2001).

1.5. AVALIAÇÃO FUNCIONAL

Pesquisas para o tratamento de lesões medulares requerem a análise funcional, onde se verifica se as diversas estratégias terapêuticas são eficazes para melhora efetiva dos animais, o que caracteriza possível aplicabilidade clínica do tratamento. Essa avaliação comportamental/motora nos modelos animais de lesão medular deve ser, preferivelmente, objetiva, não invasiva e ética (SHINOZAKI, et al., 2013).

A escala BBB (este nome foi dado a partir das iniciais dos seus desenvolvedores Basso, Beattie e Bresnahan) é um teste para ratos, específico para lesões medulares completas ou incompletas. É realizada por meio do registro da

movimentação voluntária dos animais em um aparato de campo aberto (“*open field*”). É um teste relativamente simples e fidedigno, que não requer tanta experiência e prática pelo examinador (SHINOZAKI, et al., 2013).

A avaliação consiste na observação de 10 categorias de comportamento dos ratos após lesão medular, incluindo a movimentação das patas posteriores, equilíbrio de tronco e abdome e a posição/movimentação da cauda do animal. Em cada categoria de comportamento, os observadores determinam e definem atributos como qualidade de movimentos articulares (se não há movimento articular, se é discreto ou extenso) ou frequência de descarga de peso nos passos, por exemplo (se não descarrega peso nas patas ou se essa descarga é ocasional, frequente ou consistente) (BASSO, BEATTIE, & BRESNAHAN, 1995).

As vantagens de se ter uma escala com várias categorias envolvem principalmente o aumento da confiabilidade e diminuição de erros na avaliação. As desvantagens da escala, já que esta é subjetiva, compreendem principalmente as diferenças inter-avaliadores, já que alguns podem ser mais rígidos, por exemplo, em relação a frequência dos eventos comportamentais (BASSO, BEATTIE, & BRESNAHAN, 1995).

Assim, a escala BBB é válida e apresenta uma medida bem preditiva e fidedigna da recuperação motora, capaz de distinguir a evolução comportamental dos animais submetidos a diferentes tipos de lesão. Os resultados da escala BBB mostram aos pesquisadores uma medida bem discriminada da avaliação motora dos animais lesionados, permitindo a análise de diversos tratamentos experimentais após lesão medular (BASSO, BEATTIE, & BRESNAHAN, 1995).

1.6. TERAPIA CELULAR NA LME

Os impactos físicos, psicológicos e financeiros causados pela LME no indivíduo e na sociedade em geral motivam a comunidade científica e médica na investigação e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que sejam eficazes no sentido de evitar agravamentos das lesões, diminuir os efeitos da degeneração secundária e até melhorar a função motora e sensitiva desses pacientes (KWON, TETZLAFF, GRAUER, BEINER, & VACCARO, 2004).

O tratamento para pacientes que sofreram lesão medular consiste, basicamente, na descompressão cirúrgica da medula espinhal, estabilização e fusão de vértebras instáveis após o trauma, manejo de complicações secundárias como, por exemplo, a instabilidade autonômica, além da reabilitação sensório-motora. Todas essas medidas aumentaram a sobrevida dos pacientes com lesão medular, porém ainda não há tratamento eficaz para a diminuição dos déficits neurológicos. Drogas anti-inflamatórias, como a metilprednisolona, não são mais largamente utilizadas por conta da sua eficácia limitada e os incômodos efeitos colaterais (MOTHE & TATOR, 2013).

No entanto, estratégias neuroprotetoras e anti-inflamatórias tem se mostrado promissoras. Essas estratégias consistem na redução da morte celular e na diminuição dos efeitos da lesão secundária. Porém, para potencializar a recuperação neurológica é importante não apenas atenuar a lesão medular, mas também promover regeneração e reparo tecidual (MOTHE & TATOR, 2013).

O transplante de células-tronco é uma estratégia promissora para reparação da medula espinhal, por meio de mecanismos diversos, como substituição de células neuronais e gliais que foram perdidas na lesão, remielinização de axônios,

restauração da circuitaria neuronal, preservação de células nervosas que foram poupadas na lesão inicial, aumento da expressão de neurotrofinas e citocinas nas células residentes, promoção da angiogênese, reconstituição de áreas de cavidades, diminuição da inflamação e da gliose, estimulação de células progenitoras endógenas e criação de um ambiente favorável a plasticidade e regeneração axonal (Mothe & Tator, 2012). Para esses diferentes efeitos, são testados atualmente diferentes tipos de células-tronco (MOTHE & TATOR, 2013).

Células-tronco (CT) consistem em grupos de células imaturas e multipotentes que podem ser encontradas em organismos multicelulares. Duas das principais características das células-tronco são a auto-renovação e a diferenciação multipotente (LI & LEPSKI, 2013). São divididas em duas grandes categorias: células-tronco embrionárias e células-tronco somáticas. As embrionárias têm origem na massa celular interna do blastocisto e têm a habilidade de se proliferar e se diferenciar em células das três camadas germinativas embrionárias (KEIRSTEAD, et al., 2005; JIANG, et al., 2010). A categoria das CT somáticas inclui células progenitoras endógenas, que reparam e repõe diversos tecidos no nosso corpo. Entre estas, incluem-se também células e linhagens celulares derivadas dos tecidos fetais, neonatais e adultos (como por exemplo, as células-tronco neurais e as mesenquimais) (COUTTS & KEIRSTEAD, 2008).

Atualmente, além das duas categorias mencionadas acima, pode-se observar o aumento dos estudos com células pluripotentes induzidas (iPSCs). A partir da introdução de fatores celulares de pluripotência como Sox2, Klf4, Oct 3/4 e c-Myc, fibroblastos em cultura podem expressar e se comportar como células pluripotentes. Esse tipo celular traz menos problemas éticos, menor risco de rejeição imunológica e pode ser mais eficaz em terapias regenerativas do sistema nervoso. As iPSCs são

capazes de gerar três tipos de células nervosas: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (MIURA, et al., 2009; LI & LEPSKI, 2013).

No presente estudo, utilizam-se as células mononucleares da medula óssea, que também podem ser divididas, basicamente, em dois tipos: células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco mesenquimais (CTM). Elas se diferenciam, respectivamente, em células de linhagem hematopoiética e células de linhagem mesenquimal (SOO OH, et al., 2010). Os dois grupos representam fontes celulares que podem ser facilmente obtidas e isoladas de aspirados de medula óssea, além de poder ser de fonte autóloga (WRIGHT K. , EL MASRI, OSMAN, CHOWDHURY, & JOHNSON, 2011).

As células da medula óssea são as células mais estudadas em pesquisas com animais de experimentação como roedores, mamíferos maiores e primatas não humanos. Esse fato, além do fácil acesso a esse tipo celular (com possibilidade de auto-transplante), justifica o uso das células mononucleares da medula óssea (células mesenquimais associadas às células hematopoiéticas) em alguns estudos que abordam tratamentos em humanos (TETZLAFF, et al.). Infelizmente, os trabalhos que envolvem seres humanos não incluem grande número de pacientes, usam misturas celulares presentes na medula óssea e, em sua maioria, não são estudos-controle. Portanto, ainda se faz necessária validação clínica sistemática para que o uso dessa população celular seja aprovado.

Enquanto que as CTH dão origem às células sanguíneas, as CTM podem se diferenciar em vários tipos celulares de origem mesenquimal, incluindo osteócitos, condrócitos, adipócitos e miócitos (KRABBE, ZIMMER, & MEYER, 2005). Além disso, esse último tipo de células-tronco tem um importante papel de suporte (estroma) para as CTH na medula óssea (KRABBE, ZIMMER, & MEYER, 2005).

Os mecanismos de ação das CTH e das CTM quando entram em contato com tecido medular lesionado ainda não são totalmente conhecidos. Sugere-se, atualmente, que esses tipos celulares podem diferenciar-se em linhagens gliais e até neurais a partir de vários mecanismos indutores, como manipulações químicas, genéticas e fisiológicas (WRIGHT K. , EL MASRI, OSMAN, CHOWDHURY, & JOHNSON, 2011 ; KRABBE, ZIMMER, & MEYER, 2005).

Outros estudos enfatizam as funções tróficas desses dois tipos celulares. Sabe-se que as CTH podem secretar fatores de crescimento neurotróficos como a angiopoietina-1, que tem função angiogênica (TAKAKURA, et al., 2000). Há também relatos de que as CTM podem ter função imunossupressora, o que pode reduzir a resposta inflamatória aguda, reduzir a formação das cavidades teciduais, assim como reduzir a reatividade de micróglia/macrófagos ativados e de astrócitos (HIMES B. , et al., 2006; GIRALDI-GUIMARAES, REZENDE-LIMA, BRUNO, & MENDEZ-OTERO, 2009). Além disso, as CTM podem promover a regeneração axonal ou influenciar positivamente a plasticidade funcional através da modulação de um meio inflamatório que permita o crescimento axonal (NEUHUBER, HIMES, SHUMSKY, GALLO, & FISCHER, 2005). Elas podem sintetizar algumas citocinas neurotróficas que estimulam o crescimento neural, incluindo BDNF (*brain-derived neurotrophic factor* – fator neurotrófico derivado de encéfalo), NGF (*neural growth factor* - fator de crescimento neural) e VEGF (*vascular endothelial growth factor* – fator de crescimento de endotélio vascular) (WRIGHT K. , EL MASRI, OSMAN, CHOWDHURY, & JOHNSON, 2011).

Diferentes modos de administração das células são testados como estratégia de transplante após lesão medular: intratecal, intravenoso e intramedular, todos com

vantagens e desvantagens. Para aplicação humana, a administração intravenosa é a aplicação mais fácil, prática, sem risco de aumento de lesão ao tecido nervoso (QUERTAINMONT, et al., 2012). No entanto, o transplante intramedular se mostra mais eficaz quando a neuroproteção é avaliada, criando um ambiente propício que permite a passagem de tratos ascendentes e descendentes. As células transplantadas têm boa taxa de sobrevivência e neuroproteção, além de demonstrarem que podem se diferenciar em células do fenótipo nervoso (ZURITA, et al., 2008; ZHAO, et al., 2004; FRIEDRICH, et al., 2012). Em estudos comparativos, a administração intravenosa demonstra bom grau de recuperação funcional quando comparada com controles. No entanto, a recuperação funcional demonstrada em transplantes locais na medula espinhal é progressiva e a diminuição da cavidade na área de lesão foi maior quando comparada com transplantes venosos, sugerindo diferenciação neuronal e reconstrução da medula espinhal (VAQUERO, ZURITA, OYA, & SANTOS, 2006).

1.7. HIPOTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL

Como vimos, a lesão medular consiste em uma série de eventos complexos e determinantes ao estado clínico dos pacientes acometidos. Alguns estudos experimentais observaram que o tratamento com células da medula óssea é uma estratégia terapêutica promissora para este tipo de lesão, seja diminuindo a inflamação e modulando o ambiente inflamatório, seja pela provável substituição de células lesionadas.

No presente estudo, investigamos a ação desse tipo celular no ambiente inflamatório de uma lesão incompleta crônica (42 dias em ratos). Além disso, analisamos o impacto funcional do tratamento com transplante autólogo e

intramedular de células da medula óssea. Esse tipo de transplante (autólogo e local) parece ser uma boa estratégia terapêutica para esse tipo de lesão.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. Objetivo geral

- Estudar os efeitos da terapia com células mononucleares da medula óssea sobre a preservação tecidual nas substâncias branca e cinzenta e recuperação funcional após lesão traumática da medula espinhal de ratos adultos.

1.8.2. Objetivos específicos

- Investigar as alterações motoras causadas por transecção parcial da medula espinhal de ratos adultos;
- Investigar qualitativamente e quantitativamente os efeitos da terapia celular proposta sobre a neuroinflamação, incluindo os padrões de microgliose e astrocitose;
- Investigar os padrões de recuperação funcional no modelo experimental proposto utilizando a escala BBB.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE/UFPA), sob o protocolo nº 075/2013.

Os animais e os grupos experimentais estão organizados na tabela 1.

2.1. MODELO EXPERIMENTAL DE LME E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, todos com massa corpórea entre 250-300g, com 6 meses de idade, provenientes do Biotério Central da UFPA. Todos os animais, exceto os do grupo A, foram submetidos à lesão medular por hemissecção à direita da medula espinhal (segmento T8-T9). Esse modelo experimental induz disfunção motora na pata posterior ipsilateral à hemissecção. Há também disfunção sensorial, representada por alodínia mecânica e anestesia térmica bilateral (BENNETT, EVERHART, & HULSEBOSCH, 2000; MILLS, HAINS, JOHNSON, & HULSEBOSCH, 2001; CORONEL, LABOMBARDA, VILLAR, DE NICOLA, & GONZÁLEZ, 2011). No presente estudo, avaliamos a função motora dos animais. A disfunção sensorial e suas repercussões em relação à função motora serão estudadas em um trabalho posterior.

Antes da indução da lesão medular, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (72mg/kg) e cloridrato de xilazina (9mg/kg), administradas por via intraperitoneal. Após a remissão do reflexo corneano e do reflexo de retirada da pata, foi realizada a tricotomia e a assepsia do dorso. Foi, então, realizada incisão

para expor o tecido subcutâneo. A dissecação foi realizada em camadas, com afastamento do tecido adiposo e muscular para visualização das vértebras T8, T9 e T10. Foi realizada a laminectomia destas três vértebras com o auxílio de um microalveolótomo para a exposição da medula espinhal. A hemisseção foi realizada com lâmina de bisturi nº 12 e confirmada com o auxílio de um microscópio cirúrgico. Assim, a sutura também foi realizada em camadas.

Logo após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas-padrão, com água e ração *ad libitum*. Durante o tempo de sobrevivência (42 dias), os animais foram monitorados quanto à alimentação, consumo de água, autofagia e função excretora. Massagem vesical, quando necessária, foi realizada até o retorno da função normal (em torno de 7 dias após a lesão). Os grupos experimentais estão resumidos na Tabela 1, observada abaixo.

GRUPO	EXPERIMENTO	n
A	Falso operado – animais submetidos ao procedimento cirúrgico (incluindo o procedimento de laminectomia, porém sem lesão medular).	4
B	Controle – animais submetidos à lesão medular, tratados com meio de cultura (injeção similar ao transplante com células).	4
C	Células mononucleares (CM) – animais submetidos à lesão medular, tratados com células mononucleares da medula óssea, transplantadas no tecido nervoso da ME.	5

Tabela 1- Grupos de animais experimentais que foram utilizados na pesquisa

2.2 EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Para extração de células mononucleares da medula óssea (CMMO), era necessário que os animais lesionados fossem submetidos a um novo procedimento cirúrgico um dia após a lesão da medula espinhal. Para tanto, os animais lesionados foram anestesiados a partir do mesmo protocolo utilizado no procedimento cirúrgico de indução da lesão. Após a remissão dos reflexos, foi realizada uma incisão na região lateral da coxa do animal. A fáscia lateral da coxa foi afastada para visualização da face lateral do fêmur. Com uma broca cirúrgica, foi feito um orifício na diáfise do osso para exposição do canal ósseo. Então, foi inserida uma agulha conectada à uma seringa contendo heparina (20µl) e o meio de cultura DMEM F12 (Sigma-Aldrich®, D-8900; 10X1l). A medula óssea do fêmur foi aspirada lentamente. Esse procedimento foi realizado em ambas as patas do animal.

Para a separação das células mononucleares, a medula aspirada foi diluída em solução de meio de cultura (DMEM-F12) e soro fetal bovino (200µl - Sigma-Aldrich®) e dissociada até a homogeneização da solução. A seguir, essa solução foi adicionada, cuidadosamente, a um tubo com 5 ml de Ficoll-Histopaque® (Sigma-Aldrich®, 10831-6X100XL) e centrifugada por trinta minutos a 888 rpm (400G). Após a centrifugação, as CMMO foram visualizadas, aspiradas e lavadas três vezes em solução de DMEM F12 e soro fetal bovino por cinco minutos a 2000 rpm.

Para a avaliação da viabilidade celular, as células, após as lavagens, foram diluídas em 180µl de DMEM-F12 e 20µl de soro fetal bovino. Desta solução, 50µl foram retirados e diluídos em 75µl de Azul de Tripán (Trypan Blue - Fluka®) e 175µl

de solução salina estéril. A partir daí, as células viáveis foram contadas no microscópio.

Após a avaliação da viabilidade celular, os animais foram posicionados em aparelho estereotáxico e tiveram a medula espinhal reexposta. A partir da visualização da área de lesão, cerca de 100 mil células foram transplantadas em dois sítios de injeção: um rostral e outro caudal à área de lesão (4mm anterior e 4 mm posterior à lesão). As células foram transplantadas com seringa Hamilton.

Após o transplante, os animais foram novamente suturados e recolocados nas suas gaiolas-padrão. O trauma causado na pata dos animais não causava disfunção motora significativa, já que não havia lesão muscular ou nervosa.

Os animais controle receberam um volume de meio de cultura similar ao recebido pelos animais transplantados, porém também foram submetidos à aspiração da medula óssea do fêmur.

2.3 ANÁLISE FUNCIONAL

A análise da função motora foi realizada por meio da Escala BBB. Os animais foram filmados por cinco minutos em um aparato de campo aberto redondo, com 100 centímetros de diâmetro. As filmagens sempre ocorreram no horário da noite, entre 18 e 20 horas. As avaliações ocorreram em dias determinados: “baseline” (linha de base), um dia antes da lesão medular; e nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a lesão medular.

Os vídeos foram analisados de acordo com a escala BBB. As pontuações foram tabuladas de acordo com a avaliação de cada pata posterior dos animais e foram feitas as médias de cada animal por dia de sobrevivência. As pontuações e as

descrições das análises funcionais estão descritas na Tabela 2- Descrição das pontuações referentes à escala BBB

Pontuação	Descrição
0	Sem movimentos nas patas posteriores.
1	Movimento discreto de uma ou duas articulações, usualmente o quadril e/ou o joelho.
2	Movimento extenso de uma articulação ou; Movimento extenso de uma articulação e movimento discreto de outra articulação.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto das três articulações da pata posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações da pata posterior.
8	Pedalada sem suporte de peso ou; Fixação plantar da pata sem suporte de peso.
9	Fixação plantar da pata com suporte de peso apenas na fase de apoio da marcha ou; Passos com apoio dorsal ocasionais, frequentes ou consistentes, sem passos com apoio plantar.
10	Passos com suporte plantar ocasionais, sem coordenação com as patas anteriores.

- 11** Passos com suporte plantar de frequentes a consistentes, sem coordenação com as patas anteriores.
- 12** Passos com suporte plantar de frequentes a consistentes, com coordenação ocasional com as patas anteriores.
- 13** Passos com suporte plantar de frequentes a consistentes, com coordenação frequente com patas anteriores.
- 14** Passos com suporte plantar consistente, coordenação com patas anteriores consistente e pata posicionada predominantemente de forma rodada ou;
Passos com suporte plantar frequentes, coordenação com patas anteriores consistente e passos com suporte dorsal ocasionais.
- 15** Passos com suporte plantar consistente e coordenação com patas anteriores consistente; sem movimento de cauda ou movimento ocasional; pata predominantemente paralela ao corpo no contato inicial.
- 16** Passo plantar consistente e coordenação com pata anterior consistente durante a marcha; a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o avanço da pata anterior. A pata está predominantemente posicionada paralelamente no contato inicial e rodada no início da fase de balanço.
- 17** Passo plantar consistente e coordenação com a pata anterior consistente durante a marcha; liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o avanço da pata; pata predominantemente paralela tanto no contato inicial quanto no início da fase de balanço.

- 18** Passo plantar consistente e coordenação com pata anterior consistente durante a marcha; liberação dos dedos ocorre de forma consistente durante o avanço da pata; pata predominantemente paralela no contato inicial e rodada no início da fase de balanço.
- 19** Passo plantar consistente e coordenação consistente com pata anterior durante a marcha; liberação dos dedos de forma consistente durante o avanço da pata; pata predominantemente paralela no contato inicial e durante o início da fase de balanço; cauda no solo na maior parte do tempo.
- 20** Passo plantar consistente e marcha consistentemente coordenada; liberação dos dedos consistente; pata predominantemente paralela no contato inicial e no início da fase de balanço; cauda consistentemente elevada; tronco instável.
- 21** Passo plantar consistente e marcha coordenada, liberação dos dedos consistente; pata predominantemente paralela durante o balanço, tronco estável de forma consistente; cauda consistentemente elevada.

Tabela 2- Descrição das pontuações referentes à escala BBB

A análise estatística e os gráficos da função motora foram realizados no software *GraphPad Prism 5.0*. O teste estatístico foi o ANOVA, com correção pós-teste de Kruskal-Wallis. A significância estatística foi dada pelo nível alfa de 0,05.

2.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para análise histológica, os animais foram perfundidos após 42 dias da lesão medular. Foram anestesiados a partir do mesmo protocolo já mencionado nos

procedimentos cirúrgicos. Após a remissão dos reflexos, foram perfundidos a partir do ventrículo esquerdo do coração com 500ml de solução salina a 0,9% e 500ml de Paraformaldeído 4%. As medulas espinhais foram retiradas, pós-fixadas durante 24 horas e crioprotegidas por três semanas. Após a crioproteção, as medulas foram congeladas em Tissue-Tek® *OCT compound* (Sakura®) e seccionadas no plano coronal em criostato (Microm® / modelo HM-505-E) em espessuras de 20 e 50 µm. As secções foram colocadas em lâminas histológicas gelatinizadas e congeladas a -20°C. As secções mais finas foram utilizadas para as análises imunohistoquímicas, enquanto que as mais espessas foram coradas com violeta de Cresila, para análise da área de lesão. Essa técnica de coloração evidencia os corpúsculos de Nissl, portanto mostra núcleos celulares sem especificidade.

As análises imunohistoquímicas utilizadas foram: anti-ED1 (para marcação de células microgliais ativadas) e anti-GFAP (para marcação de astrócitos fibrilares).

O protocolo de imunohistoquímica que foi utilizado já foi previamente testado (GOMES-LEAL, CORKILL, FREIRE, PICANÇO-DINIZ, & PERRY, 2004). As lâminas montadas foram retiradas do congelamento e secadas em temperatura ambiente por um dia. Em seguida, foram lavadas em solução PBS sob agitação constante por 5 minutos, imersas em tampão borato em temperatura constante de 65°C (0,2M; pH 9,0; ácido bórico da Nuclear®) e resfriadas, na mesma solução, em temperatura ambiente durante 20 minutos. Este procedimento foi feito para garantir uma intensidade melhor da imunohistoquímica. Em seguida, as secções foram lavadas novamente em PBS por 5 minutos e imersas em solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio (Merck®) (1ml de peróxido de hidrogênio/100ml de metanol), inibindo-se, assim, a peroxidase endógena das células do tecido analisado. A partir daí, inicia-se o processo imunohistoquímico propriamente dito, em que as secções serão novamente

lavadas em PBS, dessa vez com Tween® (5 minutos) e, em seguida, incubadas em soro normal de cavalo (anticorpo anti-ED-1) ou soro normal de cabra (anticorpo anti-GFAP), ambos em diluição de 10%, durante 1 hora. Após este período, as secções foram incubadas em anticorpo primário, durante uma noite, de acordo com a diluição preconizada pelo fabricante.

No dia seguinte, as secções foram novamente lavadas (PBS/Tween, 5 minutos) e incubadas em anticorpo secundário biotilado anti-camundongo feito em cavalo (1:100; para anti-ED-1) ou anti-coelho feito em cabra (1:200; para anti-GFAP) por 2 horas. Após nova lavagem, foram incubadas em ABC (complexo avidina-biotina – Vector®, kit ABC Vectastain) por 2 horas. Em seguida, segue nova lavagem e revelação. O cromógeno utilizado foi o DAB (diaminobenzidina – Sigma-Aldrich). Na sequência, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas, diafanizadas e montadas.

2.5 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS

Para análise qualitativa das lâminas histológicas após o processamento, foram avaliadas todas as lâminas dos diferentes métodos (coloração com Violeta de Cresila ou com procedimentos imunohistoquímicos) em microscópio óptico (Bioval®, L2000C) e as imagens foram captadas por câmera fotográfica (Moticam®5500-5MPixels), acoplada a microscópio óptico (Nikon® Eclipse50i).

Para análise quantitativa, o número de astrócitos e macrófagos/micróglia ativados por campo foram contados usando microscópio binocular com gradícula de contagem (0,0625mm²) em objetiva de 40x. As médias das contagens e os desvios-padrão obtidos foram plotados em coordenadas cartesianas. A contagem se deu da seguinte forma: no lado direito da medula espinhal (lado com lesão) e três campos por

região medular (funículo ventral - FV, funículo dorsal - FD, funículo lateral - FL, corno dorsal - CD, corno ventral - CV e substância cinzenta intermediária-SCI), totalizando 18 campos de contagem por secção, como observado na imagem abaixo (Figura 2).

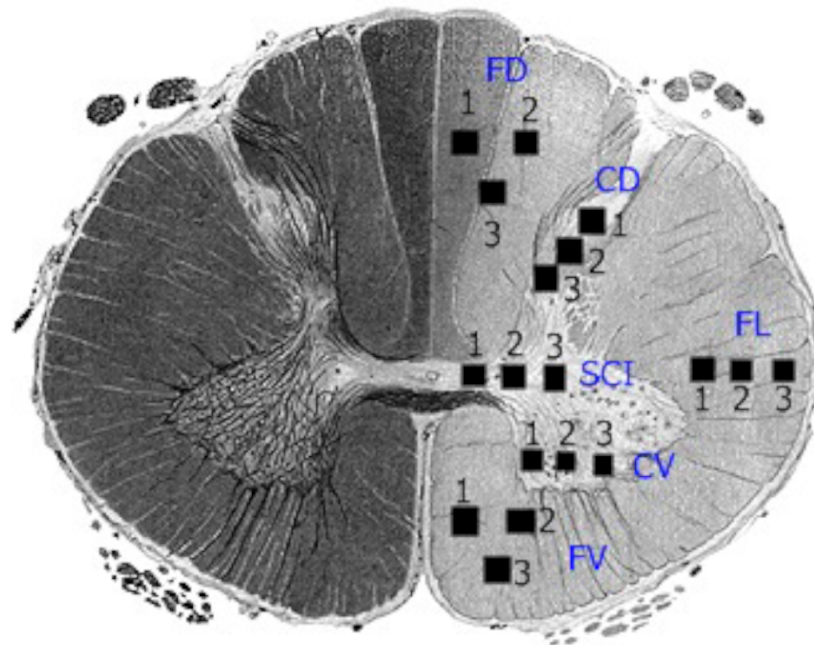


Figura 2- Representação gráfica da técnica de contagem celular utilizada no presente estudo. Foram contados 3 campos em cada região da medula espinal, totalizando 18 campos de contagem, que formaram a média final de células na secção.

A análise estatística e os gráficos da quantificação histológica foram realizados no software *GraphPad Prism 5.0*. O teste estatístico foi o teste T- pareado. A significância estatística foi dada pelo nível alfa de 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. HEMISSECÇÃO FOI EFICAZ COMO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR INCOMPLETA

Observou-se que o modelo experimental utilizado causou sinais motores característicos de lesão medular incompleta nos animais submetidos à lesão (grupos B e C). Nos primeiros dias, que representam a fase aguda da lesão, os animais apresentaram arreflexia de patas posteriores, atonia dos músculos posteriores ao segmento medular de lesão e inibição dos reflexos vesicais (bexiga neurogênica). Após a fase aguda, cerca de 5 dias após o procedimento cirúrgico, os animais apresentaram monoplegia da pata posterior ipsilateral à lesão medular. Não se testou a sensibilidade térmica nem mecânica. Assim, considera-se esse modelo eficaz para induzir lesão medular incompleta em ratos, mimetizando uma condição chamada “Síndrome de Brown-Sequard” em humanos. Atestou-se também que o modelo é uma boa alternativa a estudos que pretendem investigar os mecanismos fisiopatológicos em lesões crônicas, já que a taxa de sobrevivência é alta em comparação com outros modelos experimentais que geram lesões mais graves.

3.2. TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NÃO FOI EFICAZ PARA MELHORAR A FUNÇÃO MOTORA DOS ANIMAIS QUE SOFRERAM LESÃO MEDULAR INCOMPLETA CRÔNICA

Foram analisados 13 animais, sendo 5 tratados com células mononucleares, 4 animais controle e 4 animais “falso-operados”. A partir da avaliação dos vídeos dos animais nos tempos de sobrevivência previamente mencionados, observou-se que todos

os animais lesionados tiveram decréscimo da função motora após a lesão medular, com diferença estatística entre os animais lesionados e os falso-operados, porém não houve diferença estatística entre os animais tratados com células mononucleares e os não tratados, como se pode observar na Figura 3 e na Figura 4. Nota-se que a função motora diminui no dia 7 e atinge um “platô” por volta da quarta semana de sobrevivência, sem melhora funcional posterior.

Na figura 4, ratifica-se o resultado da análise semanal do desempenho funcional dos animais da pesquisa por meio da análise das médias gerais dos grupos experimentais. Os animais lesionados (grupo controle e tratado) tem médias na escala BBB significativamente menores que os animais do grupo falso-operado, porém, entre estes mesmos grupos, não houve diferença (médias e desvios-padrão dos grupos: falso operado, $n=4$, 21 ± 0 ; controle, $n=4$, $13,57\pm 3,88$; tratado, $n=5$, $15,07\pm 3,46$).

Pode-se dizer que o tratamento com células mononucleares que foi utilizado nesta presente pesquisa não foi eficaz no tratamento da lesão medular incompleta, do ponto de vista funcional.

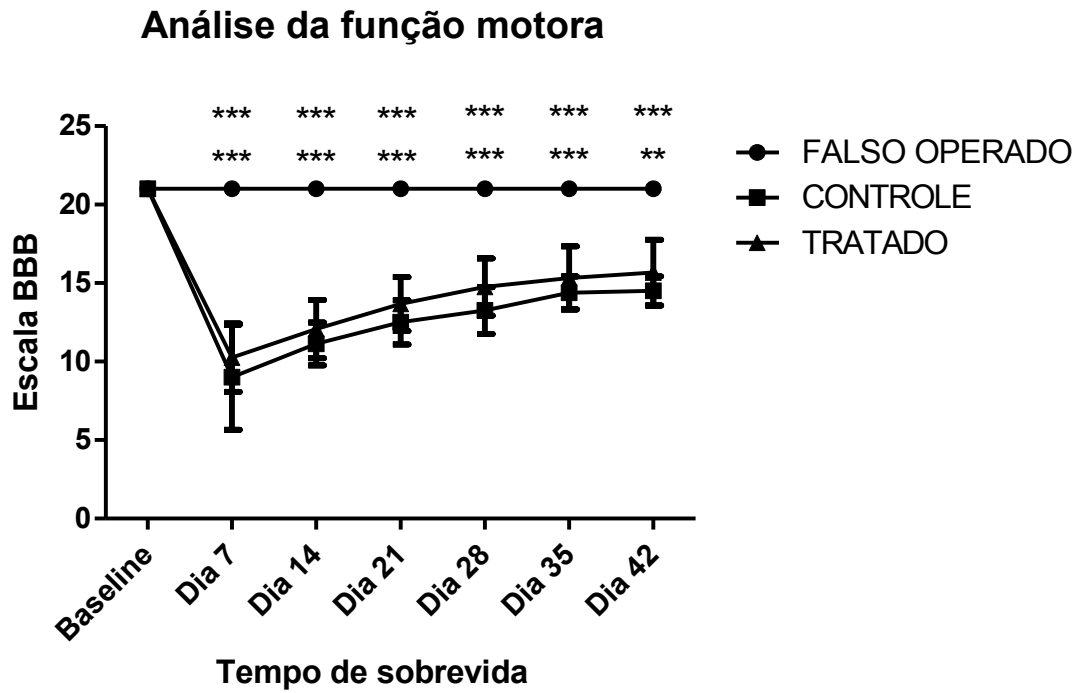


Figura 3- Gráfico da análise da função motora por semana. Os animais lesionados (tratados e controle) apresentaram diferença estatística em relação aos animais falso operados (***) = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$). Não houve diferença estatística entre os animais controle e os tratados com células mononucleares.

Avaliação da função motora (médias entre grupos)

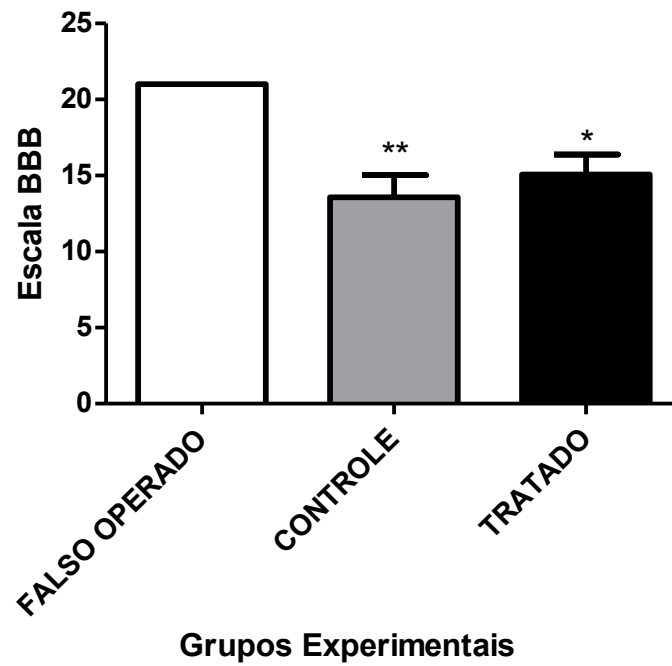


Figura 4- Gráfico das médias gerais dos grupos experimentais em relação à escala BBB. Ratifica a diferença estatística entre os grupos dos animais lesionados (controle e tratado) em relação ao grupo falso operado (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$). Não houve diferença estatística entre os animais tratados e controle.

3.3. TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DIMINUIU INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA MEDULA ESPINHAL APÓS LESÃO INCOMPLETA

A preservação tecidual foi avaliada qualitativamente pela técnica de violeta de Cresila.

A figura 4 mostra, em A, que os animais falso-operados não apresentaram lesão do tecido nervoso nem dano mecânico visível. Apresentaram preservação da densidade celular no tempo de sobrevivência investigado (42 dias).

Nos animais lesionados, tanto animais controle quanto tratados, intenso infiltrado inflamatório, mesmo em tempo de sobrevivência crônico. Na imagem B, não se observa preservação das estruturas anatômicas da medula espinhal (canal central da medula espinhal, cornos e colunas, por exemplo). Já na imagem C, observa-se preservação do canal central da medula espinhal e infiltrado inflamatório menos intenso que em B.

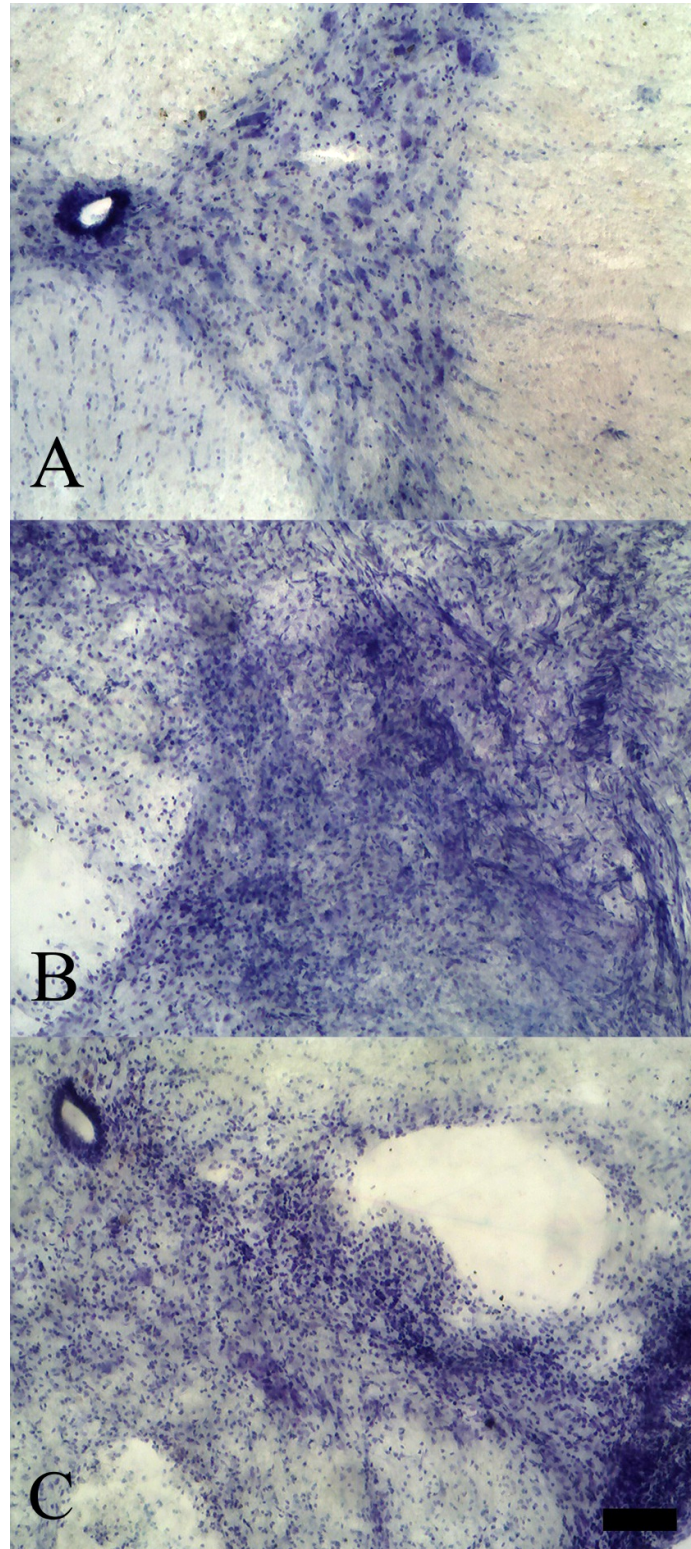


Figura 5- Análise qualitativa da área de lesão com coloração de violeta de cresila. A, animal falso operado; B, animal lesionado sem tratamento; C, animal tratado com células mononucleares. Escala: 50 μ m, objetiva 10x.

3.4. TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DIMINUIU ATIVAÇÃO DE CÉLULAS MICROGLIAIS NA SUBSTÂNCIA BRANCA DA MEDULA ESPINHAL APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA CRÔNICA

A análise da ativação das células microgliais foi realizada por meio de análise qualitativa e quantitativa das células marcadas com o anticorpo ED-1, que marca macrófagos ativados derivados de células microgliais residentes no tecido nervoso e monócitos sanguíneos.

Comparando os grupos estudados qualitativamente, há ativação de células ED-1 no tecido nervoso da medula espinhal lesionada no tempo de sobrevivência de 42 dias. Essa ativação foi maior nos animais controle quando comparados com os animais tratados com células mononucleares. A quantificação das células ED1-positivas confirmou esse achado, como pode-se observar no gráfico abaixo (animais controle: $19,52 \pm 7,79$; animais tratados: $10,04 \pm 2,37$). Portanto, podemos afirmar que o tratamento com células mononucleares foi eficaz na diminuição das células microgliais ativadas após 42 dias de lesão da medula espinhal.

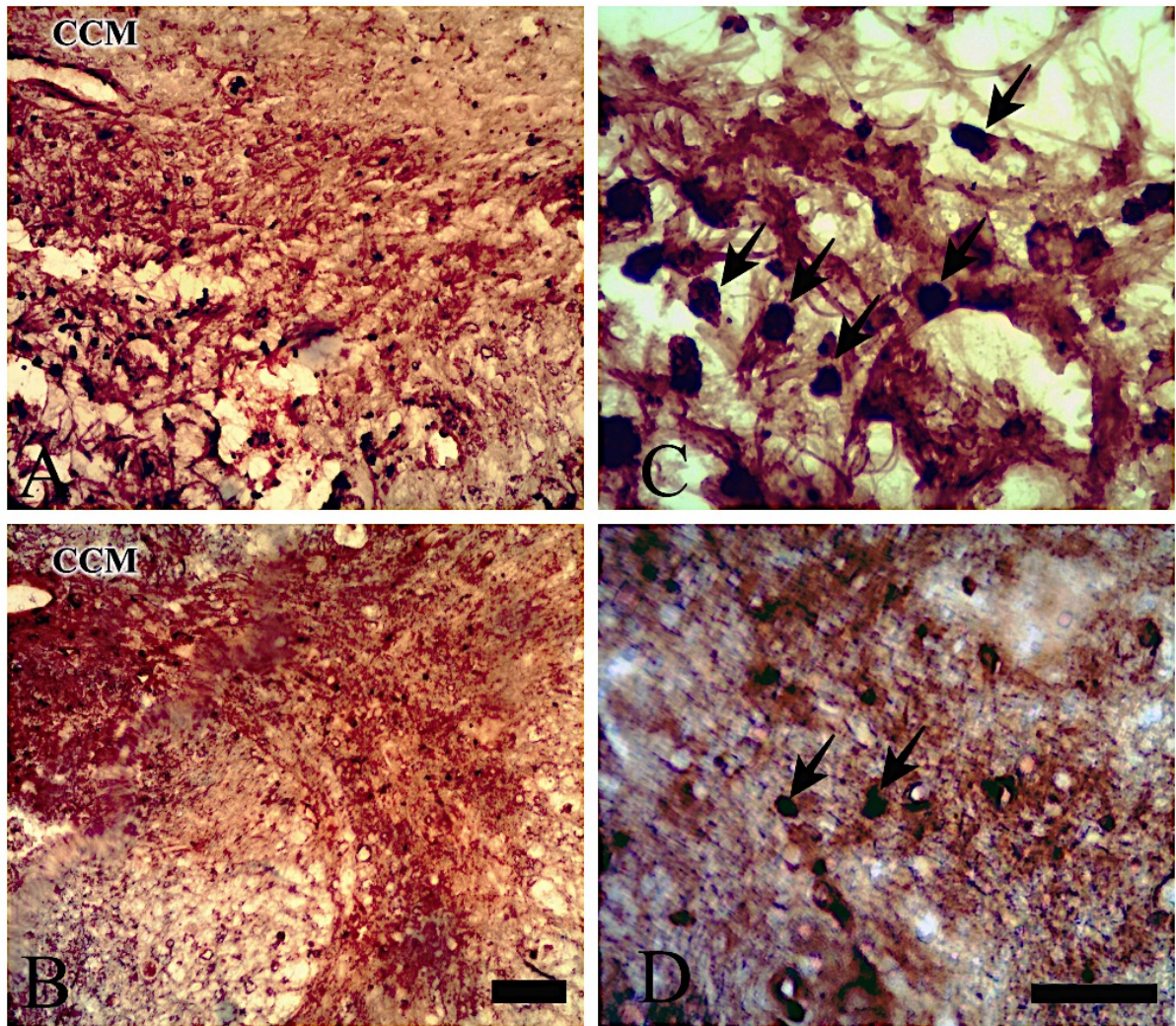


Figura 6- Padrão de ativação microglial/macrofágica por meio da marcação com anticorpo anti-ED-1. A e C, animal controle. B e D, animal tratado com células mononucleares da medula óssea. Escala: 50 μ m, objetiva 10x.

Contagem de células ED-1-positivas

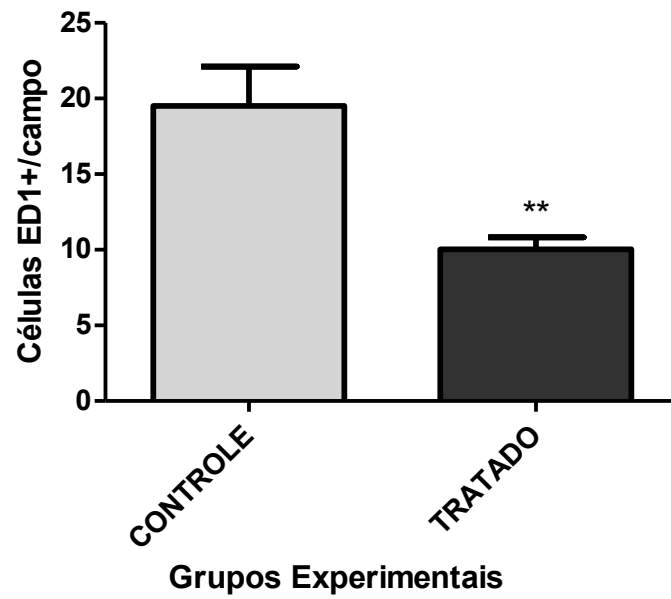


Figura 7: Análise quantitativa do número de células ED-1+ na substância branca da medula espinhal após lesão incompleta por hemissecção. Representação com média e desvio-padrão. ** representa diferença estatística entre os grupos controle e tratado.

3.5. TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NÃO ALTEROU A PROLIFERAÇÃO DE ASTRÓCITOS NA SUBSTÂNCIA BRANCA DA MEDULA ESPINHAL APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA CRÔNICA

A astrocitose foi avaliada por meio da imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP, marcador específico para astrócitos fibrilares (marca especificamente uma proteína presente no citoesqueleto dos astrócitos). Observa-se mudança na reatividade dos astrócitos após lesão medular incompleta. Essa astrocitose é caracterizada por aumento na densidade do corpo astrocitário e na redução do comprimento das ramificações dessas células. A Figura 8 nos mostra a comparação qualitativa entre animal “falso operado” (A), animal controle (B) e animal tratado com células mononucleares (C). Em B e C, observa-se intensa ativação astrocitária, mesmo após 42 dias de lesão. Qualitativamente, não há diferença entre os animais tratados e não tratados. A quantificação das células GFAP-positivas confirmou o achado qualitativo, como se pode observar no gráfico X abaixo (médias dos grupos: animais controle tiveram média de 17,74 células por campo, com desvio-padrão de 2,757; animais tratados tiveram média de 14,46 células por campo, com desvio-padrão de 5,283).

Portanto, podemos afirmar que o tratamento com células mononucleares não foi eficaz na diminuição da quantidade de astrócitos após 42 dias de lesão crônica da medula espinhal.

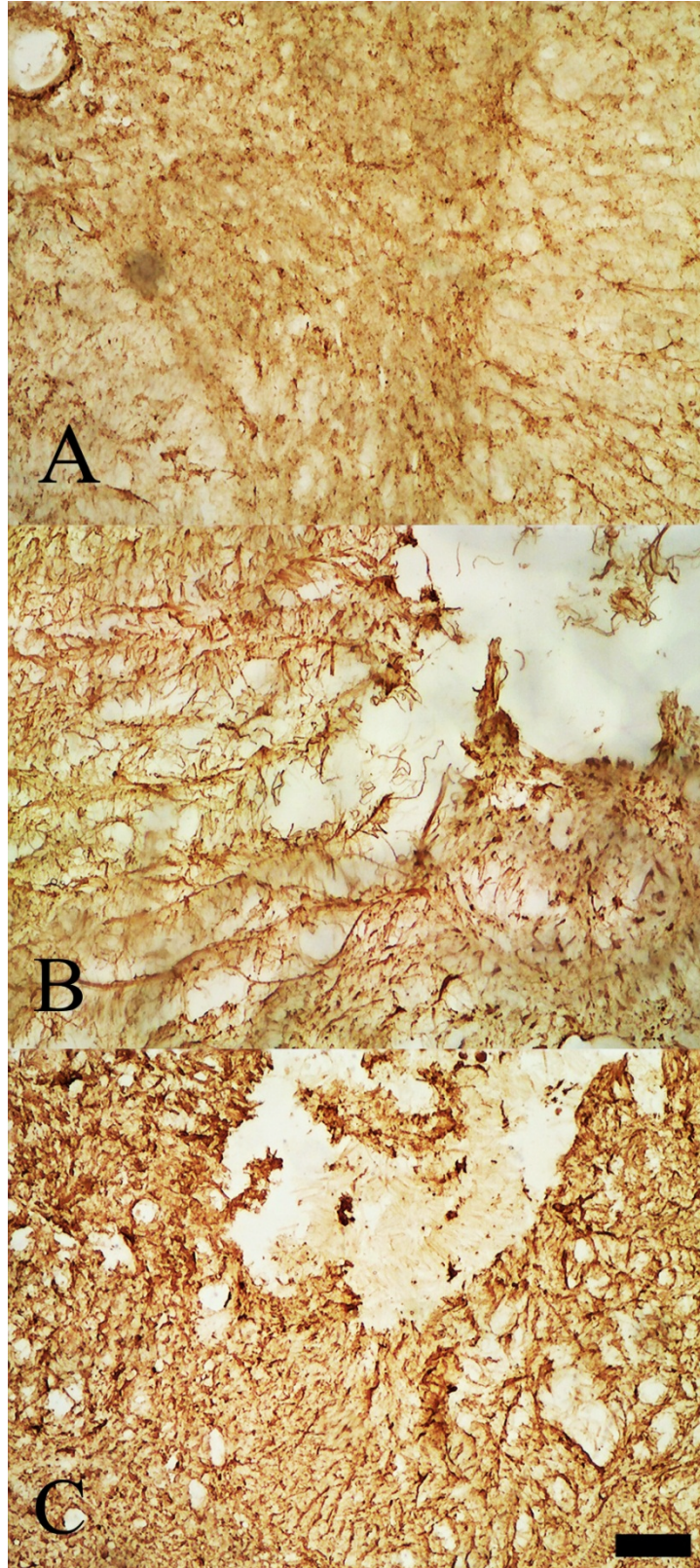


Figura 8- Padrão de astrocitose por meio da marcação com anticorpo anti-GFAP. A, animal falso-operado. B, animal controle. C, animal tratado com células mononucleares da medula óssea. Escala: 50 μ m, objetiva 10x.

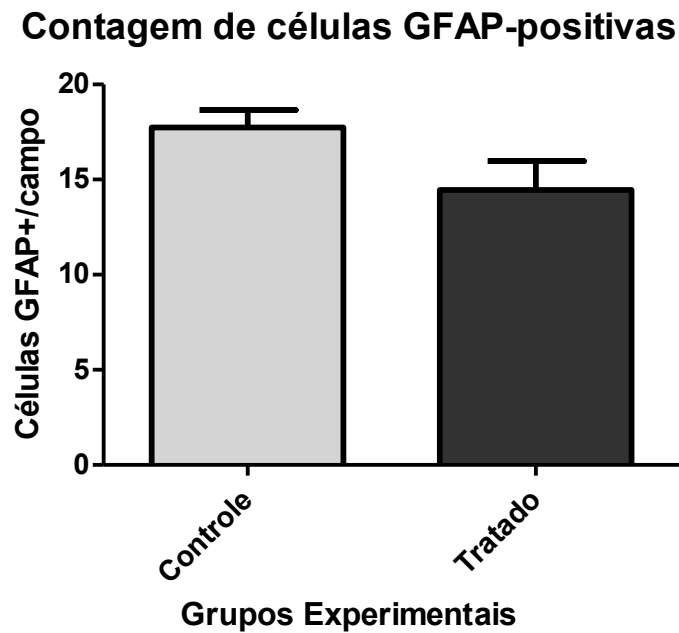


Figura 9- Análise quantitativa do número de células GFAP+ na substância branca da medula espinhal após lesão incompleta por hemissecção. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. O tratamento com células mononucleares não foi eficaz para diminuir astrocitose na substância branca da medula espinhal lesionada.

4. DISCUSSÃO

4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente trabalho, realizou-se secção parcial (hemissecção) da medula espinhal de ratos adultos no segmento torácico (T9-T10), com o objetivo de investigar os efeitos das células mononucleares da medula óssea (CMMO) no tecido lesionado e na função motora dos animais após 42 dias de lesão. Essas células foram provenientes do próprio animal, caracterizando um transplante autólogo. Foram avaliados os seguintes parâmetros: função motora (por meio da avaliação por escala BBB), infiltrado inflamatório, área de lesão, ativação microglial e ativação astrocitária na medula espinhal.

Observou-se, de maneira geral, efeito positivo das CMMO na ativação microglial, reduzindo o número dessas células inflamatórias. Porém, não houve diferença estatística quando comparamos com o grupo controle em relação à função motora e a ativação de astrócitos.

Apesar dos mecanismos de ação das CMMO não estarem tão claros, algumas hipóteses podem justificar o efeito benéfico na redução da ativação microglial, como sua ação imunossupressora (HIMES B. , et al., 2006); (SCHWARTING, et al., 2008) e a secreção de citocinas (ZHUKAREVA, OBROCKA, HOULE, FISCHER, & NEUHUBER, 2010) e fatores tróficos úteis ao tecido nervoso lesionado (YOSHIHARA, et al., 2007) (WRIGHT K. , EL MASRI, OSMAN, CHOWDHURY, & JOHNSON, 2010).

4.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL

O modelo experimental utilizado no presente estudo foi a secção parcial (hemissecção) à direita, no segmento torácico da medula espinhal de ratos adultos, para produzir disfunção motora moderada nos animais experimentais (monoplegia). Observou-se, mesmo após 42 dias de lesão, intenso infiltrado inflamatório, ativação microglial e ativação astrocitária no lado direito da medula espinhal onde a lesão foi induzida.

Os roedores são os animais de experimentação mais utilizados para mimetizar as lesões medulares que ocorrem em humanos, a fim de aprofundar o estudo da fisiopatologia e testar novas estratégias terapêuticas. Geralmente, as secções, sejam completas ou incompletas, juntamente com as contusões e compressões, são os modelos experimentais mais difundidos para as pesquisas (NOUT, et al., 2012).

A hemissecção proporciona controle preciso do local e extensão da lesão, além de não ser uma lesão tão brusca quanto uma secção completa da medula. Este tipo de lesão também favorece os cuidados com os animais, já que as disfunções autonômicas não são tão severas, favorecendo a sobrevivência dos animais (NOUT, et al., 2012).

Esse tipo de lesão experimental mimetiza nos animais uma síndrome medular humana conhecida como Síndrome de Brown-Séquard. Ela é caracterizada pela perda ipsilateral da motricidade, disfunção do trato corticoespinhal e da propriocepção, perda da sensação vibratória e do tato epicrítico. É caracterizada também pela perda contralateral da sensibilidade para dor e temperatura. Em humanos, essa síndrome é geralmente causada por lesão penetrante em um dos lados da medula espinhal (geralmente decorrente de lesões por arma branca, em casos de violência urbana) ou

tumores e abscessos localizados na medula espinhal (Canto, et al., 2005). Portanto, a hemissecção experimental em ratos é relevante clinicamente e pode ser utilizada de forma eficaz na pesquisa em relação à fisiopatologia e novos tratamentos para lesões medulares, já que mimetiza um tipo de síndrome clínica comum entre seres humanos.

4.3. FUNÇÃO MOTORA APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA

Como observamos, o tratamento com células mononucleares da medula óssea usado neste presente trabalho não obteve resultados estatisticamente diferentes dos animais tratados somente com o meio de cultura das células, depois da análise realizada com a escala BBB .

Em um outro trabalho similar, porém com tratamento baseado em implante de matriz conjuntiva, houve melhora funcional após 14 semanas de lesão por hemissecção. É importante ressaltar que até 6 semanas os animais tratados e não tratados deste estudo tiveram desempenho igual e apenas após 7 semanas de sobrevida, os animais tratados obtiveram melhor desempenho (PERTICI, et al., 2013). Uma das perspectivas futuras ao nosso tratamento é analisar os animais em tempos ainda mais longos, para observar a longo prazo o efeito das células.

O uso de imunossupressores também parece ser benéfico do ponto de vista funcional para a lesão medular incompleta após 7 semanas (ROOZBEHI, JOGHATAIE, MEHDIZADEH, MIRZAEI, & DELAVIZ, 2012). Esses resultados mostram o potencial terapêutico e funcional de estratégias que visam diminuir a infiltração de células inflamatórias.

4.4. ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA

No presente estudo, observou-se diminuição da ativação microglial em lesão medular incompleta crônica após tratamento com células mononucleares da medula óssea. Este dado foi mostrado pela contagem de células ED1+, as quais tem seu número reduzido pelo tratamento. Estatisticamente, o grupo tratado com células mononucleares reduziu de maneira significativa a ativação de macrófagos/células microgliais ativados no tecido nervoso, em comparação com o grupo controle.

As células microgliais ativadas/macrófagos tem papel dual em relação a lesão secundária nas lesões medulares (ZHOU, HE, & REN, 2014). Em pesquisas anteriores, a redução da infiltração de macrófagos diminuiu o dano tecidual secundário após lesões medulares (POPOVICH, WEI, & STOKES, 1997). Após as lesões medulares, os macrófagos derivados do sangue migram para o centro da lesão medular, enquanto que as células microgliais se localizam nas bordas da lesão. As células que ficam nas bordas isolam a lesão e bloqueiam o alastramento do dano. As células ativadas que migram para o centro da lesão fazem a fagocitose de células apoptóticas e necróticas, além dos debris do tecido, como debris da bainha de mielina e outros elementos (DAVID & KRONER, 2011). Um estudo recente mostra que as células microgliais ativadas tem um papel mais importante na limpeza do dano 3 dias após a lesão, enquanto que os macrófagos derivados do sangue contribuem para a fagocitose em tempos mais crônicos, em até 42 dias após a lesão (GREENHALGH & DAVID, 2014).

Recentemente, as células microgliais foram classificadas de acordo com a expressão de alguns marcadores de membrana celular, enzimas intracelulares e moléculas secretadas. Podem ser classificadas em M1 e M2 (ZHOU, HE, & REN,

2014) (SHECHTER & SCHWARTZ, 2013). M1 e M2 são os dois primeiros subgrupos a chegar na área de lesão. Dependendo do fenótipo e do estado de ativação dos macrófagos, eles não só iniciam o dano secundário, como iniciam a reparação tecidual. Os fenótipos e funções dos macrófagos na lesão medular podem mudar de acordo com o microambiente da lesão (STOUT & SUTTLES, 2004) (MENZIES, HENRIQUEZ, ALEXANDER, & ROBERTS, 2009). As células microgliais M1 (CD-86+) e M2 (arginase-1+) permanecem no centro da lesão durante a primeira semana após o evento traumático, porém apenas o fenótipo M1 permanece até 28 dias após a lesão em camundongos. Outros dados também sugerem que a fagocitose de restos teciduais feita pelos macrófagos é detectada até 1 a 2 semanas após lesão (ZHOU, HE, & REN, 2014).

Em nosso trabalho, investigamos a ativação microglial em 42 dias após a lesão traumática. De acordo com a literatura, os fenótipos M1 e M2 permanecem no centro de lesão como principais fenótipos microgliais até 28 dias após a lesão. Em estudos próximos, investigaremos as diferentes linhagens de células microgliais/macrofágicas a fim de investigar os que interferem diretamente em lesões crônicas, já que, como sugerimos, ainda há ativação microglial/macrofágica em 42 dias após o trauma.

4.5. ASTROCITOSE APÓS LESÃO MEDULAR INCOMPLETA

O presente estudo avaliou a astrocitose (proliferação de astrócitos) em lesão medular incompleta crônica por meio do anticorpo anti-GFAP, marcador específico para astrócitos fibrilares. Observou-se intensa ativação de astrócitos e que não houve diferença estatística quantitativa na astrocitose tanto em animais controle quanto

tratados. Ou seja, o tratamento com células mononucleares da medula óssea não influenciou na astrocitose.

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC e modulam a transdução sináptica por meio da interação com os neurônios. Essas células, quando ativadas, exibem morfologia hipertrófica, com ramificações mais curtas e espessas, além de expressar intensamente anti-GFAP e S100B (NAKAGAWA & KANEKO, 2010).

Esse tipo celular exerce várias funções importantes em relação a homeostase do SNC, incluindo a regulação das reações imunes. Juntamente com as células imunes já tradicionais, os astrócitos expressam também alguns mediadores pró-inflamatórios. Após isquemias cerebrais, por exemplo, os astrócitos são ativados, contribuindo para a gliose reativa e a formação de cicatriz glial.

A resposta astrocítica começa no centro de lesão entre 4 horas até um dia após a injúria e atinge seu pico por volta de 4 dias, sendo observada em até 28 dias após isquemia encefálica. A cicatriz glial formada pelos astrócitos funciona como barreira que evita o crescimento axonal e a reinervação, impedindo recuperação funcional. No entanto, ao separar o tecido com dano do tecido ainda viável, acaba também por impedir o crescimento da lesão. Os astrócitos também expressam citocinas, quimiocinas, além de desenvolver uma resposta Th2, o que já foi demonstrado em lesões experimentais de isquemia cerebral. (Nowicka, Rogozinska, Aleksy, Witte, & Skangiel-Kramaska, 2008); (KIM, KAWABORI, & YENARI, 2014); (KADHIM, DUCHATEAU, & SÉBIRE, 2008)

CONCLUSÕES

- Observamos alterações motoras significativas nos animais após hemissecção da medula espinhal, como monoplegia e alterações sensoriais na pata contralateral à lesão;
- As células mononucleares da medula óssea diminuíram significativamente a ativação microglial da medula espinhal após hemissecção;
- As células mononucleares da medula óssea não alteraram a ativação dos astrócitos da medula espinhal após hemissecção;
- As células mononucleares da medula óssea não alteraram significativamente a disfunção motora após hemissecção da medula espinhal.

REFERÊNCIAS

- ANKENY, D. P., & POPOVICH, P. G. (2009). MECHANISMS AND IMPLICATIONS OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES AFTER TRAUMATIC SPINAL CORD INJURY. *Neuroscience*, pp. 1112–1121.
- BASSO, M., BEATTIE, M. S., & BRESNAHAN, J. C. (1995). A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. *Journal of Neurotrauma*, pp. 1-21.
- BENNETT, A. D., EVERHART, A. W., & HULSEBOSCH, C. E. (2000). Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. *Brain Research*, pp. 72–82.
- BUFFO, A., ROLANDO, C., & CERUTI, S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochemical Pharmacology*, pp. 77-89.
- CADOTTE, D. W., & FEHLINGS, M. G. (2010, November 16). Spinal Cord Injury: A Systematic Review of Current Treatment Options. *Clinical Orthopaedics and Related Research*.
- Canto, F. R., Canto, R. S., Baraúna, M. A., Blout, M., Santos Neto, P. R., & Sanchez, H. M. (1 de Novembro de 2005). Lesão medular aguda. *Moreira Jr Editora*, pp. 521-527.
- CHEN, Y., TANG, Y., VOGEL, L. C., & DEVIVO, M. J. (2013). Causes of Spinal Cord Injury. *Top Spinal Cord Injury Rehabilitation*, pp. 1–8.

- CORONEL, M. F., LABOMBARDA, F., VILLAR, M. J., DE NICOLA, A. F., & GONZÁLEZ, S. L. (January de 2011). Progesterone Prevents Allodynia After Experimental Spinal Cord Injury. *The Journal of Pain*, pp. 71-83.
- COUTTS, M., & KEIRSTEAD, H. (2008). Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Experimental Neurology*, pp. 368-377.
- DAVID, S., & KRONER, A. (July de 2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, pp. 388-399.
- DONNELLY, D. J., & POPOVICH, P. G. (30 de June de 2007). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, pp. 378–388.
- EK, C. J., HABGOOD, M. D., CALLAWAY, J. K., DENNIS, R., DZIEGIELEWSKA, K. M., POTTER, A., . . . SAUNDERS, N. R. (2010, August). Spatio-Temporal Progression of Grey and White Matter Damage Following Contusion Injury in Rat Spinal Cord. *PLoS ONE*.
- FAROOQUI, A. A., ONG, W.-Y., & HORROCKS, L. A. (2008). Neurochemical Aspects of Excitotoxicity. *Ohio State University Publication*.
- FERRAZ DE CAMPOS, M., RIBEIRO, A. T., LISTIK, S., PEREIRA, C. A., ANDRADE SOBRINHO, J. D., & RAPOPORT, A. (Março de 2008). EPIDEMIOLOGIA DO TRAUMATISMO DA COLUNA VERTEBRAL. *Rev. Col. Bras. Cir.*, pp. 088-093.
- FRIEDRICH, M., MARTINS, M., ARAÚJO, M., KLAMT, C., VEDOLIN, L., GARICOCHEA, B., . . . FREITAS, G. (2012). Intra-arterial infusion of

autologous bone marrow mononuclear cells in patients with moderate to severe middle cerebral artery acute ischemic stroke. *Cell transplantation*.

GIRALDI-GUIMARAES, A., REZENDE-LIMA, M., BRUNO, F., & MENDEZ-OTERO, R. (9 de February de 2009). Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. *Brain Research*.

GOMES-LEAL, W. (29 de February de 2012). Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain and Behavior*.

GOMES-LEAL, W., CORKILL, D., FREIRE, M., PICANÇO-DINIZ, C., & PERRY, V. (2004). Astrocytosis, microglial activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. *Experimental Neurology*, pp. 456-467.

GREENHALGH, A. D., & DAVID, S. (30 de April de 2014). Differences in the Phagocytic Response of Microglia and Peripheral Macrophages after Spinal Cord Injury and Its Effects on Cell Death. *The Journal of Neuroscience*, pp. 6316 – 6322.

HAUBEN, E., & SCHWARTZ, M. (2003). Therapeutic vaccination for spinal cord injury: helping the body to cure itself. *Trends in Pharmacological Sciences*, pp. 7-12.

HIMES, B., NEUHUBER, B., COLEMAN, C., KUSHNER, R., SWANGER, S., KOPEN, G., . . . FISCHER, I. (2006). Recovery of function following grafting of

human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord.
Neurorehabil Neural Repair , pp. 278-296.

HIMES, B., NEUHUBER, B., COLEMAN, C., KUSHNER, R., SWANGER, S.,
 KOPEN, G., . . . FISCHER, I. (2006). Recovery of function following grafting of
 human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord.
Neurorehabilitation Neural Repair, pp. 278-296.

HIROSE, K., OKAJIMA, K., TAOKA, Y., UCHIBA, M., TAGAMI, H., NAKANO, K., . . .
 KITAMURA, N. (2000). Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-
 induce spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *Annals of
 Surgery*, pp. 272-280.

HULSEBOSCH, C. E. (2002, December). RECENT ADVANCES IN
 PATHOPHYSIOLOGY AND TREATMENT OF SPINAL CORD INJURY.
ADVANCES IN PHYSIOLOGY EDUCATION, pp. 238-255.

JIANG, J., LV, Z., GU, Y., LI, J., XU, L., XU, W., . . . XU, J. (2010). Adult rat
 mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and
 express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. *Neuroscience
 Research*, pp. 46-52.

KEIRSTEAD, H., NISTOR, G., BERNAL, G., TOTOIU, M., CLOUTIER, F., SHARP,
 K., & STEWARD, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived
 oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion
 after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, pp. 4694-4705.

Koyanagi, I. (s.d.).

- KOYANAGI, I., TATOR, C. H., & THERIAULT, E. (1993, February). Silicone rubber microangiography of acute spinal cord injury in the rat. *Neurosurgery*, pp. 260-268.
- KOZLOWSKI, P., ROSICKA, P., LIU, J., YUNG, A. C., & TETZLAFF, W. (2014). In vivo longitudinal Myelin Water Imaging in rat spinal cord following dorsal column transection injury. *Magnetic Resonance Imaging*, pp. 250-258.
- KRABBE, C., ZIMMER, J., & MEYER, M. (November/December de 2005). Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells – a critical review. *APMIS*, pp. 831-44.
- KWON, B. K., TETZLAFF, W., GRAUER, J. N., BEINER, J., & VACCARO, A. R. (2004). Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The Spine Journal*, pp. 451–464.
- LI, J., & LEPSKI, G. (2013). Cell Transplantation for Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *BioMed Research International*, p. 32 pages.
- LI, S., & STYS, P. K. (2000, February 1). Mechanisms of Ionotropic Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxicity in Isolated Spinal Cord White Matter. *Journal of Neuroscience*, pp. 1190-1198.
- LIU, X. Z., XU, X. M., HU, R., DU, C., ZHANG, S. X., MCDONALD, J. W., . . . CHOI, D. W. (1997, July 15). Neuronal and Glial Apoptosis after Traumatic Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, pp. 5395-5406.
- MATUTE, C. (February de 2010). Calcium dyshomeostasis in white matter pathology. *Cell Calcium*, pp. 150-7.

MENZIES, F., HENRIQUEZ, F., ALEXANDER, J., & ROBERTS, C. (2009).

Sequential expression of macrophage anti-microbial/inflammatory and wound healing markers following innate, alternative and classical activation. *Clinical and Experimental Immunology*, pp. 369–379.

MILLS, C. D., HAINS, B. C., JOHNSON, K. M., & HULSEBOSCH, C. E. (2001).

Strain and Model Differences in Behavioral Outcomes after Spinal Cord Injury in Rat. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA*, pp. 743-756.

MILLS, C. D., HAINS, B. C., JOHNSON, K. M., & HULSEBOSCH, C. E. (2001,

August). Strain and Model Differences in Behavioral Outcomes after Spinal Cord Injury in Rat. *Journal of Neurotrauma*, pp. 743-756.

Ministério da Saúde. (2001). *POLÍTICA NACIONAL DE REDUÇÃO DA*

MORBIMORTALIDADE POR ACIDENTES E VIOLÊNCIAS - PORTARIA GM/MS Nº 737. Brasília.

MIURA, K., OKADA, Y., AOI, T., OKADA, A., TAKAHASHI, K., OKITA, K., . . .

YAMANAKA, S. (2009, July 9). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotechnology*, pp. 743 - 745.

Mothe, A. J., & Tator, C. H. (2012, November). Advances in stem cell therapy. *The*

Journal of Clinical Investigation, pp. 3824–3834.

MOTHE, A. J., & TATOR, C. H. (2013, July 26). Review of transplantation of neural

stem/progenitor cells for spinal cord injury. *International Journal of Developmental Neuroscience*, pp. 701–713.

- NAKAGAWA, T., & KANEKO, S. (6 de October de 2010). Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. *Journal of Phamacological Sciences*, pp. 347-353.
- NEUHUBER, B., HIMES, T., SHUMSKY, J., 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*, pp. 73-85.
- NOUT, Y., ROSENZWEIG, E., BROCK, J., STRAND, S., MOSEANKO, R., HAWBECKER, S., . . . TUSZYNSKI, M. (2012). Animal models of neurologic disorders: a nonhuman primate model of spinal cord injury. *Neurotherapeutics*, pp. 380-392.
- PEDRAM, H., REZA, Z. M., REZA, R. M., VACCARO, A. R., & VAFA, R.-M. (2010). Spinal fractures resulting from traumatic injuries. *Chinese Journal of Traumatology*, pp. 3-9.
- PEREIRA, M. E., & ARAUJO, T. C. (jan./abr. de 2006). Enfrentamento e reabilitação de portadores de lesão medular e seus cuidadores. *PSICO*, pp. 37-45.
- PERTICI, V., AMENDOLA, J., LAURIN, J., GIGMES, D., MADASCHI, L., CARELLI, S., . . . DECHERCHI, P. (2013). The use of poly(N-[2-hydroxypropyl]-methacrylamide) hydrogel to repair a T10 spinal cord hemisection in rat: a behavioural, electrophysiological and anatomical examination. *ASN NEURO*.
- PIROUZMAND, F. (2010, February). Epidemiological trends of spine and spinal cord injuries in the largest Canadian adult trauma center from 1986 to 2006. *Journal of Neurosurgery: Spine*, pp. 131–140.

- POPOVICH, P., WEI, P., & STOKES, B. (1997). Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *The Journal of Comparative Neurology*, pp. 443-464.
- QUERTAINMONT, R., CANTINIEAUX, D., BOTMAN, O., SID, S., SCHOENEN, J., & FRANZEN, R. (2012, June 20). Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. *PLoS ONE*, pp. 1-15.
- ROOZBEHI, A., JOGHATAIE, M., MEHDIZADEH, M., MIRZAEI, A., & DELAVIZ, H. (2012). The Effects of Cyclosporin-A on Functional Outcome and Axonal Regrowth Following Spinal Cord Injury in Adult Rats . *Acta Medica Iranica*.
- SCHNELL, L., FEARN, S., KLASSEN, H., SCHWAB, M., & PERRY, V. (1999). Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur. J. Neurosci*, pp. 3648– 3658.
- SCHWARTING, S. (s.d.).
- SCHWARTING, S., LITWAK, S., HAO, W., BAHR, M., WEISE, J., & NEUMANN, H. (2008). Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. *Stroke*, pp. 2867-2875.
- SHECHTER, R., & SCHWARTZ, M. (2013). Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. *Journal of Pathology*, pp. 332–346.
- SHINOZAKI, M., YASUDA, A., NORI, S., SAITO, N., TOYAMA, Y., OKANO, H., & NAKAMURA, M. (2013, October 7). Novel Method for Analyzing Locomotor

- Ability after Spinal Cord Injury in Rats: Technical Note. *Neurol Med Chir*, pp. 907–913.
- SILVA, N. A., SOUSA, N., REIS, R. L., & SALGADO, A. J. (2013, November 20). From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*, pp. 25–57.
- SOO OH, J., HA, Y., SU AN, S., KHAN, M., PENNANT, W., KIM, H., . . . KIM, K. (2010). Hypoxia-preconditioned adipose tissue-derived mesenchymal stem cell increase the survival and gene expression of engineered neural stem cells in a spinal cord injury model. *Neuroscience Letters*, pp. 215-219.
- STOUT, R., & SUTTLES, J. (September de 2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *Journal of Leukocyte Biology*, pp. 509-513.
- SYNTICHAKI, P., & TAVERNARAKIS, N. (2003). The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? . *Nature Reviews*, pp. 672-684.
- TAKAKURA, N., WATANABE, T., SUENOBU, S., YAMADA, Y., NODA, T., ITO, Y., . . . SUDA, T. (2000). A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell*, pp. 199-209.
- TETZLAFF, W., OKON, E. B., KARIMI-ABDOLREZAEE, S., HILL, C. E., SPARLING, J. S., PLEMEL, J. R., . . . TSAI, E. C. (s.d.).
- VAQUERO, J., ZURITA, M., OYA, S., & SANTOS, M. (May de 2006). Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: Systemic or local administration? *Neuroscience Letters*, pp. 129–134.

- VON BUDINGEN, H., TANUMA, N., VILLOSLADA, P., OUALLET, J., HAUSER, S., & GENAIN, C. (2001). Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination. *J. Clin. Immunol*, pp. 155–170.
- WASSERMAN, J. K., & SCHLICHTER, L. C. (2008, August 16). White matter injury in young and aged rats after intracerebral hemorrhage. *Experimental Neurology*, pp. 266–275.
- WRIGHT, K., EL MASRI, W., OSMAN, A., CHOWDHURY, J., & JOHNSON, W. (2010). Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical application. *Stem Cells - Translational and Clinical Research*.
- WRIGHT, K., EL MASRI, W., OSMAN, A., CHOWDHURY, J., & JOHNSON, W. (February de 2011). Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical application. *Stem Cells*, pp. 169-78.
- YANG, H., LU, P., MCKAY, H. M., BERNOT, T., KEIRSTEAD, H., STEWARD, O., . . . TUSZYNSKI, M. H. (2006, February 22). Endogenous Neurogenesis Replaces Oligodendrocytes and Astrocytes after Primate Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, pp. 2157–2166.
- YOSHIHARA, H., ARAI, F., HOSOKAWA, K., HAGIWARA, T., TAKUBO, K., NAKAMURA, Y., . . . SUDA, T. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*, pp. 685-97.
- ZHAO, Z. M., LI, H. J., LIU, H. Y., LU, S. H., YANG, R. C., ZHANG, Q. J., & HAN, Z. C. (2004). Intraspinal Transplantation of CD34+ Human Umbilical Cord Blood

Cells After Spinal Cord Hemisection Injury Improves Functional Recovery in Adult Rats. *Cell Transplantation*, pp. 113-122.

ZHOU, X., HE, X., & REN, Y. (15 de October de 2014). Function of microglia and macrophages in secondary damage after spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*, pp. 1787-1795.

ZHUKAREVA, V., OBROCKA, M., HOULE, J., FISCHER, I., & NEUHUBER, B. (2010). Secretion profile of human bone marrow stromal cells: dono variability and response to inflammatory stimuli. *Cytokine*, pp. 317-321.

ZURITA, M., VAQUERO, J., BONILLA, C., SANTOS, M., HARO, J. D., OYA, S., & AGUAYO, C. (2008). Functional Recovery of Chronic Paraplegic Pigs After Autologous Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells. *Transplantation*, pp. 845–853.