



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ASSOCIAÇÃO DE TREINO LOCOMOTOR EM ESTEIRA E CÉLULAS-TRONCO
NO TRATAMENTO DA LESÃO MEDULAR EXPERIMENTAL**

Fabício do Couto Nicola

PORTO ALEGRE

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ASSOCIAÇÃO DE TREINO LOCOMOTOR EM ESTEIRA E CÉLULAS-TRONCO
NO TRATAMENTO DA LESÃO MEDULAR EXPERIMENTAL**

Fabício do Couto Nicola

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Neurociências

PORTO ALEGRE

2013

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Carlos Alexandre Netto, de quem tenho admiração e respeito, por ter me acolhido, orientado e pela confiança;
- A Professora Dr. Patrícia Pranke, pela oportunidade de trabalho com células-tronco;
- Ao Professor Dr. Luciano Rodrigues, pela colaboração, carinho, pelas lições de vida e sempre valiosa companhia;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências pela oportunidade de estudo;
- Aos professores do PPG em Neurociências que superam o perímetro da sala de aula com seus ensinamentos, os quais eu tenho muito apreço;
- Aos colegas, pelo convívio e por sempre estarem dispostos a ajudar; Thayane Crestani, Kerlin Quintiliano, Eduardo Sanches, Lígia Boisserand, Suelen Wilborn, Lauren Valentin, Marília Marques. À todos os outros colegas eu agradeço;
- À técnica Silvia Barbosa, por estar presente e sempre ávida em resolver os problemas;
- À Professora Dr. Lígia Centenaro, pelos valiosos ensinamentos;
- Aos meus pais, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas;
- À minha namorada, pelo carinho e apoio;
- À UFRGS pela oportunidade de realização deste trabalho;
- À CAPES, pela bolsa concedida durante meu período de estudos.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | VI |
| LISTA DE ABREVIATURAS | VII |
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | X |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Fisiopatologia da lesão medular | 3 |
| 1.2 Treino locomotor em esteira | 8 |
| 1.3 Células-tronco (CT) | 12 |
| 1.3.1 <i>Prováveis mecanismos de ação</i> | 15 |
| 1.4 Justificativa | 17 |
| 1.5 Hipótese | 18 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 Objetivo Geral | 19 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 19 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 Animais | 20 |
| 3.2 Lesão medular traumática | 21 |
| 3.3 Obtenção das células-tronco mesenquimais de polpa de dentes humanos decíduos | 23 |
| 3.4 Caracterização imunofenotípica e pluripotência das células-tronco mesenquimais de dente decíduos | 24 |
| 3.5 Transplante de células-tronco na lesão raqui-medular | 25 |
| 3.6 Protocolo de treino locomotor em esteira | 25 |
| 3.7 Avaliação da recuperação motora | 26 |
| 3.8 Análise morfológica | 26 |
| 3.8.1 <i>Perfusão</i> | 26 |
| 3.8.2 <i>Análise da área de cavitação</i> | 27 |
| 3.8.3 <i>Imunofluorescência</i> | 27 |
| 3.8.4 <i>Quantificação da imunofluorescência</i> | 28 |
| 3.9 Análise estatística | 29 |
| 4. RESULTADOS | 30 |
| 4.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais de polpa de dente decíduo (SHEDS) | 30 |
| 4.2 Avaliação comportamental – locomotora | 30 |
| 4.3 Histologia – Área de cavitação | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4 Análise da imunofluorescência | 34 |
| 4.4.1 Expressão de GFAP..... | 36 |
| 4.4.2 Expressão de NF-M | 38 |
| 5. DISCUSSÃO | 41 |
| 5.1 Recuperação da função motora..... | 41 |
| 5.2 Influência dos tratamentos no tecido | 44 |
| 5.2.1 Área de cavitação..... | 44 |
| 5.2.2 Expressão de GFAP por astrócitos | 45 |
| 5.2.3 Expressão de neurofilamento pelos neurônios..... | 47 |
| 5.2.4 Mecanismos de ação | 48 |
| 6. CONCLUSÕES | 51 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 52 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |
| ANEXOS | 67 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Desenho esquemático da classificação topográfica funcional (tetraplegia e paraplegia). | 5 |
| Figura 2. Resumo dos eventos após lesão medular..... | 7 |
| Figura 3. Principais características das três fases da lesão medular no tecido..... | 8 |
| Figura 4. Esquema ilustrativo do CPG situado na medula espinhal | 10 |
| Figura 5. Desenho esquemático da auto-renovação e diferenciação de células-tronco | 13 |
| Figura 6. Prevenção da apoptose do oligodendrócito pelas CTMs. | 16 |
| Figura 7. Desenho experimental..... | 21 |
| Figura 8. <i>NYU Impactor</i> | 22 |
| Figura 9. Alturas da haste..... | 22 |
| Figura 10. Esteira ergométrica para ratos INSIGHT®. | 25 |
| Figura 11. Campo aberto circular para a análise da atividade locomotora avaliada pela escala de BBB. | 26 |
| Figura 12. Resultado da avaliação locomotora pela Escala BBB. | 32 |
| Figura 13. Imagens representativas das áreas de cavidade cística das medulas espinhas dos diferentes grupos..... | 33 |
| Figura 14. Resultado da quantificação da área cística | 33 |
| Figura 15. Identificação das células transplantadas expressando o antígeno para anti-núcleo humano (HuNu). | 34 |
| Figura 16. Dupla marcação mostrando as células transplantadas marcadas com HuNu e GFAP para a identificação dos astrócitos.. | 35 |
| Figura 17. Dupla marcação mostrando as células transplantadas marcadas com HuNu (representado em verde) e NF-M (representado em vermelho) para a identificação dos neurônios. | 36 |
| Figura 18. Região ao redor da lesão de cortes longitudinais de medula espinhal marcadas com GFAP | 37 |
| Figura 19. Quantificação expressão de GFAP ao redor da lesão, obtida de quatro regiões de interesse, rostral e caudal nos diferentes grupos.. | 38 |
| Figura 20. Imagens representativas de cortes longitudinais de medula espinhal no nível de T10 marcadas com NF-M | 39 |
| Figura 21. Expressão de NF-M no epicentro da lesão..... | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP** – Adenosina Monofosfato
- APC** - *Adenomatous Polyposis Coli*
- BBB** – Escala de Basso, Beatie e Bresnahan
- BDNF** – *Brain - Derived Neurotrophic Factor*
- CTM** – Célula-tronco Mesenquimal
- CPG** - Gerador Central de Padrão
- CSPG** – Proteoglicano - Sulfato de Condroitina
- CT** – Célula-tronco
- CTH** – Célula-tronco Hematopoiética
- CTN** – Célula-tronco Neural
- DMEM** - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- FGF2** - *Fibroblast Growth Factor – 2*
- GFAP** - *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- HuNu** – Anti-Núcleo Humano
- ICAM-1** - Molécula de Adesão Intercelular - 1
- IGF** - *Insulin-Like Growth Factor*
- NeuN** – Proteína específica do núcleo neuronal
- NG2** – Proteoglicano – Sulfato de Condroitina Produzido por Oligodendrócitos
- NSCISC** - *National Spinal Cord Injury Statistical Center*
- NYU** – *New York University*
- PBS** – Solução Salina Tamponada com Fosfato
- PFA** – Paraformaldeído
- SHEDs** – Células-tronco mesenquimal de dente decíduo humano
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- TESP** – Treino em Esteira com Suporte de Peso
- TGFβ** - *Transforming Growth Factor – Beta*
- TNF-α** - Fator de Necrose Tumoral Alfa
- VEGF** - *Vascular Endothelial Growth Factor*

RESUMO

A lesão medular é considerada uma patologia incapacitante, para a qual até o momento não há tratamento eficaz. A lesão medular resulta em perda de tecido, incluindo tratos de fibras mielinizadas que carregam informações motoras e sensoriais. Além dos déficits sensitivos e motores, existem as alterações viscerais e tróficas relacionadas com o nível da lesão e o tipo de lesão. O treino locomotor em esteira e o transplante de células-tronco têm sido utilizados como estratégias de recuperação no intuito de otimizar a recuperação da lesão medular experimental em ratos, porém, vêm sendo abordadas separadamente.

O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia do treino locomotor em esteira, do transplante de células-tronco mesenquimais de dente decíduo humano (SHEDs), e da combinação entre os tratamentos avaliando a recuperação da função motora e a regeneração medular após a lesão medular traumática em ratos Wistar machos utilizando o equipamento *NYU Impactor*. Os objetivos específicos foram comparar os efeitos do transplante de SHEDs com o treino locomotor em esteira e a combinação entre os tratamentos quanto à recuperação da função motora e histológica; demonstrar a possível diferenciação das SHEDs transplantadas, bem como a sua integração no tecido da medula lesada. Os resultados obtidos demonstram que o transplante de SHEDs e a combinação entre os tratamentos favorece a recuperação da função motora após a lesão medular em ratos Wistar, enquanto apenas o tratamento com o treino locomotor não se mostra eficaz. Observamos neuroproteção do tecido medular evidenciada pela redução da cavidade cística nos animais tratados com a combinação de transplante de SHEDs e o treino locomotor. Houve redução da cicatriz glial e aumento na expressão de neurofilamento médio (NF-M) no grupo SHEDs. As células transplantadas sobreviveram e se integraram ao tecido, não havendo indícios de diferenciação em astrócitos e/ou neurônios. Houve um aumento na cicatriz glial no grupo lesão e no grupo lesão tratado com treino locomotor, associado a maiores áreas de cavidade cística e baixa expressão de NF-M.

A partir de nossos resultados, podemos concluir que o transplante de SHEDs, assim como a combinação entre transplante de SHEDs e treino locomotor, promovem a recuperação da função motora após lesão medular por contusão. Apesar da sobrevivência e integração das SHEDs ao tecido, não houve

diferenciação em astrócitos e/ou neurônios. Apenas o transplante celular foi capaz de reduzir a cicatriz glial e manter a expressão de neurofilamento.

ABSTRACT

Spinal cord injury is a disabling traumatic condition and available therapeutic approaches are poorly effective. Spinal cord injury results in loss of tissue, including myelinated fiber tracts that carry sensory and motor information. In addition to motor and sensory deficits, there are visceral and trophic changes related to the level of injury and type of injury. In the search for new treatments, stem cells transplants and treadmill training have been studied separately to minimize spinal injury in experimental rats.

The objective of this study is to evaluate the effectiveness of treatments between treadmill training, the transplantation of human exfoliated deciduous teeth (SHEDs), and the combination of treatments for functional recovery and regeneration of injured spinal cord in an experimental model of contusion spinal cord injury in rats Wistar reproduced by *NYU Impactor* device. The main goals were compare the effects of SHEDs transplantation with treadmill training and the combination of treatments for functional recovery and histology; demonstrate the possible differentiation of cells implanted, as well as their integration into the damage tissue. The results demonstrate that transplantation of SHEDs and combination of treatments promotes functional recovery after spinal cord injury in rats, while treatment with only the treadmill training is not efficient. Reduction of cystic cavity in the animals treated with the combination of transplantation and treadmill training was observed as an evidence of neuroprotection. We observed glial scar reduction and increased expression of neurofilament medium (NF-M) in the SHEDs group. The transplanted cells survived and integrated into the tissue, with no evidence of differentiation into astrocytes and/or neurons. Larger areas of cystic cavity, increase in glial scar and low expression of NF-M was seen in the treadmill training group.

From our results, we conclude that transplantation of SHEDs, as well as the combination of transplant and treadmill training promotes functional recovery after spinal cord injury. Although the survival and integration of SHEDs on tissue, differentiation in astrocyte and/or neuron of transplanted the cells was not detected. Only cell transplantation was able to reduce the glial scar and to maintain the expression of neurofilament.

1. INTRODUÇÃO

As lesões medulares constituem entidades nosológicas causadas por eventos traumáticos que acometem anualmente milhares de indivíduos de todas as faixas etárias, e apresentam elevadas taxas de mortalidade e morbidade crônica (GONDIM, 1998; SUMIDA, 2001). O *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (NSCISC), nos EUA, relata incidência anual de 11.000 novos casos de lesão medular por trauma, ou 40 por um milhão de habitantes, com uma prevalência de 250.000 novos casos (JACKSON *et al.*, 2004).

A lesão medular resulta em perda de tecido, incluindo tratos de fibras mielinizadas que carregam informações motoras e sensoriais (as vias descendentes e as vias ascendentes) (BRACKEN *et al.*, 1990). Além dos déficits sensitivos e motores, alterações viscerais e tróficas relacionadas com o nível da lesão (local da lesão na medula) e o tipo de lesão (completa ou incompleta) (ROWLAND, 2002) geralmente resultam em perda permanente da função motora e sensorial por apresentar mielinização anormal, que está associada com a redução ou bloqueio da condução axonal (WRATHALL *et al.*, 1998) deixando os indivíduos em condição de paraplegia, paraparesia, tetraplegia ou tetraparesia (ROWLAND, 2002).

Entre as causas mais comuns de lesão medular, estão os acidentes automobilísticos com 50,4 % dos casos. Contribuindo com o espectro de etiologia estão as quedas, que contabilizam 23,8 % dos casos, a violência com 11,2 % dos casos, e os acidentes durante a prática de esportes com 9 % dos casos (HO *et al.*, 2007).

De acordo com o NSCISC (2009), 30,1 % dos pacientes com lesão medular têm tetraparesia, 25,6 % paraplegia, 20,4 % tetraplegia e 18,5 % têm paraparesia. Nos indivíduos que possuem lesão medular completa, ou seja, paraplegia ou tetraplegia, não há a presença de movimento voluntário da musculatura esquelética abaixo do nível da lesão (MAYNARD *et al.*, 1997). No entanto, para que se desenvolva uma marcha normal, é preciso de parâmetros como força, amplitude de movimento, coordenação, propriocepção e exterocepção dos membros inferiores, assim como equilíbrio preservado, além da postura, visão e planejamento de movimento. Alguns desses fatores têm sido reconhecidos como parâmetros chave para o progresso da marcha (BARBEAU, 2003).

Devido aos efeitos deletérios causados pela lesão medular, muitos indivíduos não recuperam a habilidade de caminhar, embora isto seja uma meta primária da reabilitação (BEHRMAN; HARKEMA, 2000). Menos de 1% dos pacientes com lesão

medular do tipo completa, tem total recuperação neurológica (NSCISC, 2009), sendo que a severidade e o tempo de lesão medular são fatores chave na recuperação da marcha (BARBEAU, 2003).

Tendo em vista estudar os mecanismos que permeiam a lesão medular, diversos modelos experimentais com animais foram desenvolvidos para mimetizar a lesão medular que ocorre em humanos. Os modelos incluem a transecção completa da medula com lâmina cirúrgica (SAKAI et al., 2012), os cliques de compressão (PARR et al., 2008), e o modelo mais utilizado para reproduzir a lesão medular por contusão, o equipamento *NYU Impactor* (GRUNER, 1992).

O *NYU Impactor* desenvolvido e descrito por Gruner (1992) foi projetado para ser um equipamento confiável, preciso, simples de operar e com baixos custos. Ele consiste de um peso (10 g) que pode ser elevado a 6,25; 12,5; 25; 50 ou 75 mm acima da superfície da medula, produzindo uma gama de lesões crônicas que variam de muito leve a completa paraplegia. Neste modelo, a laminectomia é realizada no nível vertebral de T10, sendo que as vértebras T8 e T11 são fixadas pelo equipamento nos processos transversos. Após liberado, o peso é acelerado pela força da gravidade até se chocar com a medula espinhal exposta no nível vertebral de T10 do animal, produzindo assim a lesão medular. A superfície de contato do peso é de 2,5 mm de diâmetro, sendo usado para animais de 200-350 g. Um computador e um programa conectados com o equipamento *NYU Impactor*, recebe as informações dos sensores da posição vertebral, sensores do cabo ligado ao peso e do sensor de contato com o tecido, o qual armazena os dados brutos e exhibe as curvas de impacto no monitor. Os dados como altura, tempo e velocidade de queda, compressão da medula e outros parâmetros são computados e salvos em um disco.

1.1 Fisiopatologia da lesão medular

A medula espinhal contém tratos espinhais orientados longitudinalmente (substância branca) em torno de áreas centrais (substância cinzenta) onde a maioria dos corpos celulares estão localizados. A substância cinzenta está organizada em segmentos compostos por neurônios motores e sensoriais. Axônios de neurônios sensoriais entram na medula espinhal e axônios dos neurônios motores deixam a medula espinhal através de nervos ou raízes. Cada raiz recebe informação sensorial de áreas da pele, sendo assim chamadas de dermatômos. Similarmente, cada raiz

inerva um grupo de músculos, sendo chamada de miótomo. Enquanto um dermatomo representa a inervação de uma região da pele, no miótomo, a maioria dos músculos são inervados por mais de uma raiz, então, cada músculo é representado por duas ou mais raízes (MAYNARD; BRACKEN; CREASEY, 1997).

A lesão medular resulta em perda de tecido, incluindo tratos de fibras mielinizadas (as vias descendentes e as vias ascendentes) que carregam informações motoras e sensoriais (BRACKEN *et al.*, 1990). As pessoas que sofrem lesão medular podem apresentar o quadro de paraplegia ou paraparesia, se a lesão for abaixo do nível medular T1, e tetraplegia ou tetraparesia, se for acima deste nível (Figura 01) (MAYNARD; BRACKEN; CREASEY, 1997). Quando não há preservação sensitiva e motora abaixo do nível de lesão, é considerada lesão completa (WATERS; ADKINS; YAKURA, 1991), enquanto que a lesão incompleta é classificada quando há a preservação parcial da sensibilidade e/ou se há função motora abaixo do nível neurológico acometido, incluindo os níveis mais baixos do segmento sacral (MAYNARD; BRACKEN; CREASEY, 1997).

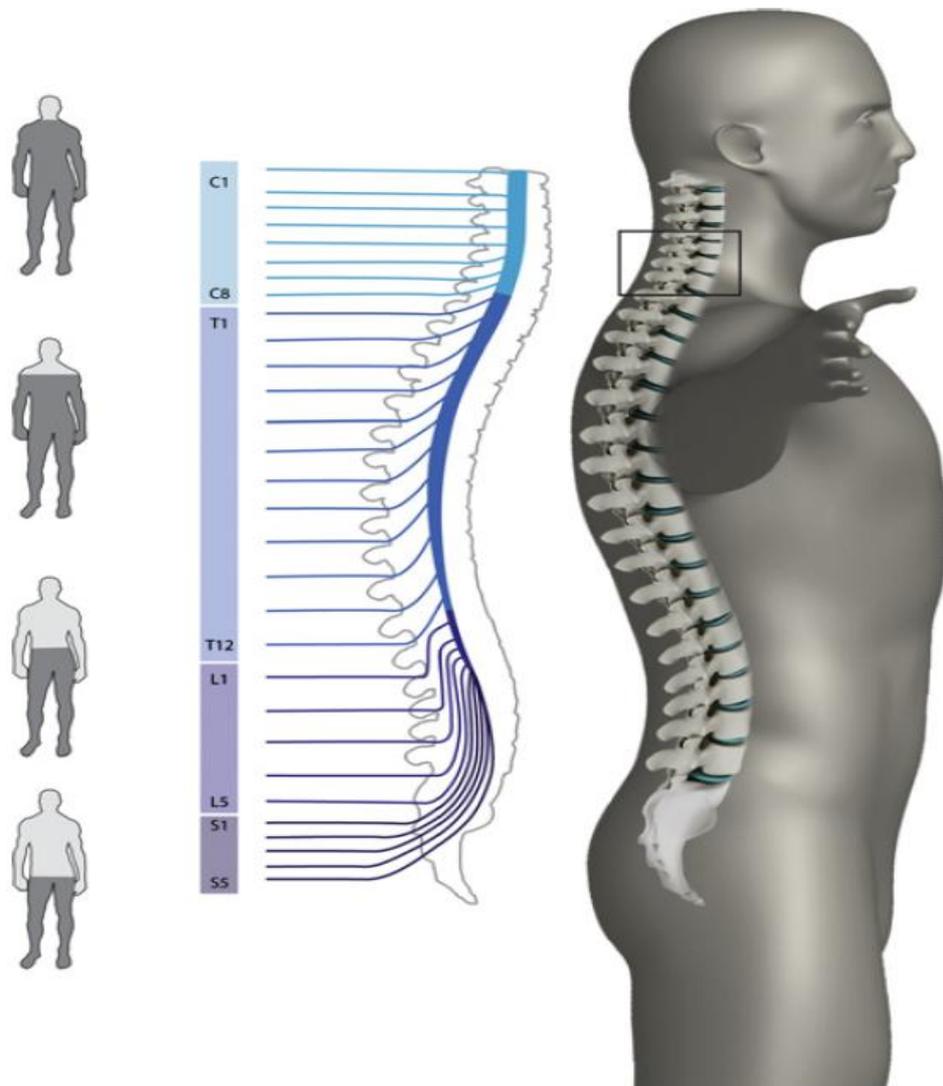


Figura 1. Desenho esquemático da classificação topográfica funcional (tetraplegia e paraplegia). Adaptado de BARNABÉ-HEIDER; FRISÉN, 2008.

A lesão axonal é um fator importante para a exacerbação dos déficits funcionais, principalmente pelo bloqueio total ou disfunção no padrão de condução do potencial de ação. A lesão axonal é um fenômeno frequente em doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, tais como no trauma da medula espinhal. Em modelo animal a maior parte da injúria ao neurônio e glia está completada dentro de 24 horas após lesão medular, mas a morte celular de oligodendrócitos ocorre por várias semanas degenerando os tratos de substância branca (McDONALD; HOWARD, 2002).

Embora após o trauma mecânico ocorra uma rápida morte de células neurais e gliais, existe ainda a resposta secundária que se segue (PROFYRIS *et al.*, 2004,

FLEMING *et al.*, 2006, BORGENS; LIU-SNYDER, 2012). Uma desmielinização ocorre após a lesão devido à resposta secundária, que produz várias moléculas inibidoras que colaboram para a falta de regeneração (BUSCH; SILVER, 2007, McGEE; STRITTMATTER, 2003), sendo a desmielinização um importante fator que contribui para a incapacidade após a lesão medular devido ao fato do axônio, que permanece anatomicamente intacto, estar fisiologicamente disfuncional, devido ao bloqueio da condução no nível da lesão. Estudos em modelos animais sugerem que a desmielinização contribua para a disfunção neurológica após a lesão medular (McDONALD; HOWARD, 2002).

Após a lesão inicial, também se inicia uma cadeia de eventos que leva a morte celular, cicatrizes e perda de função. A todos esses eventos após o trauma primário se denomina resposta secundária. O trauma inicial causa danos às células e provoca distúrbios na circulação local. As células danificadas liberam toxinas que causam necrose das células acima e abaixo do local de lesão. O local de lesão que resulta do trauma apresenta muitos obstáculos para promover a regeneração. Eventos subsequentes incluem a formação de uma cavidade cística no local de lesão, que é cercada por cicatriz glial, composto principalmente por astrócitos reativos (FAWCETT; ASHER, 1999). Exames histopatológicos realizados em humanos post-mortem durante a fase aguda mostram 3 diferentes áreas: a zona 1, que inclui áreas com características inflamatórias, zona 2, áreas com tumefação axonal, inflamação e degeneração walleriana, e a zona 3, histologicamente intacta. As células inflamatórias são frequentemente encontradas na zona 1 e às vezes na zona 2 (FLEMING *et al.*, 2006).

Os acontecimentos pós-traumáticos ou dano secundário desempenham um importante papel nos eventos patofisiológicos, e estão relacionados com a liberação de vários mediadores inflamatórios, pró-inflamatórios e citocinas na circulação sanguínea de humanos com lesão medular crônica, como a interleucina 6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) entre outras (SEGUAL *et al.*, 1997). No meio extracelular da medula espinhal lesada de ratos ocorre um aumento da concentração de aminoácidos excitatórios, iniciando a excitotoxicidade que tem relação com a perda de fibras nervosas vizinhas, neurônios e oligodendrócitos que até então, estavam intactos (TATOR; FEHLINGS, 1991). O que contribui para novos danos neurais e funcionais após o trauma na medula (SHUMAN; BRESNAHAN; BEATTIE, 1997).

Em ratos, na resposta a todos esses eventos, muitos tipos diferentes de células, como macrófagos, os precursores de oligodendrócitos e as células das meninges, migram para o local da lesão em diferentes momentos na tentativa de reparar o dano. No entanto, a cicatriz glial que se forma é constituída predominantemente de astrócitos reativos (FAWCETT; ASHER, 1999, KARIMI-ABDOLREZAEI; BILLAKANTI, 2012). Os astrócitos são densos, e secretam moléculas inibidoras para a matriz extracelular, o que torna difícil a regeneração dos neurônios lesados no sítio da lesão, devido a principal classe de moléculas inibidoras produzidas por astrócitos reativos como o proteoglicano - sulfato de condroitina (CSPGs) (FOK-SEANG *et al.*, 1995).

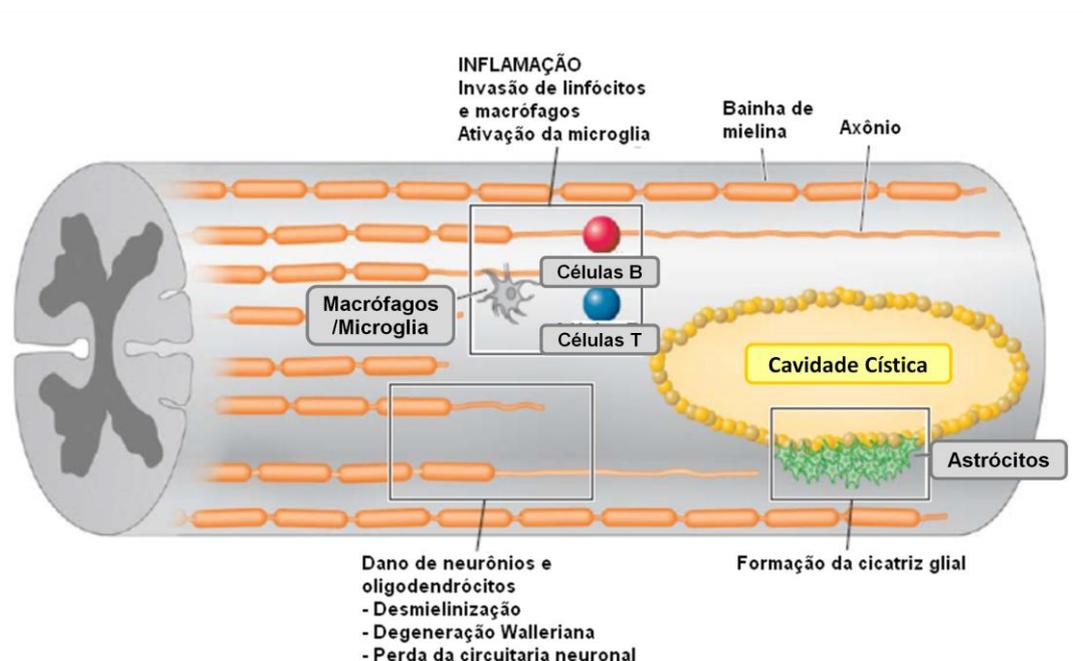


Figura 2. Resumo dos eventos após lesão medular. Representação de neurônios funcionalmente intactos, com a preservação da bainha de mielina. Fibras neuronais intactas, funcionalmente inativas pela perda da bainha de mielina. Invasão de leucócitos, representados pelas células B e células T, também fazendo parte do processo inflamatório, a microglia e macrófagos. Formação de cavidade cística com a presença de astrócitos, contribuindo com a cicatrização do tecido. Adaptado de OBERMAIR; SCHROTER; THALLMAIR, 2008.

Resumidamente, os eventos no tecido em resposta a lesão medular são divididos em três fases, seguindo uma seqüência distinta, mas com sobreposições temporais: fase aguda (segundos a minutos após a lesão), fase sub-aguda (minutos a semanas após a lesão) e crônica (meses a anos após a lesão) (Figura 03) (OYINBO, 2011).

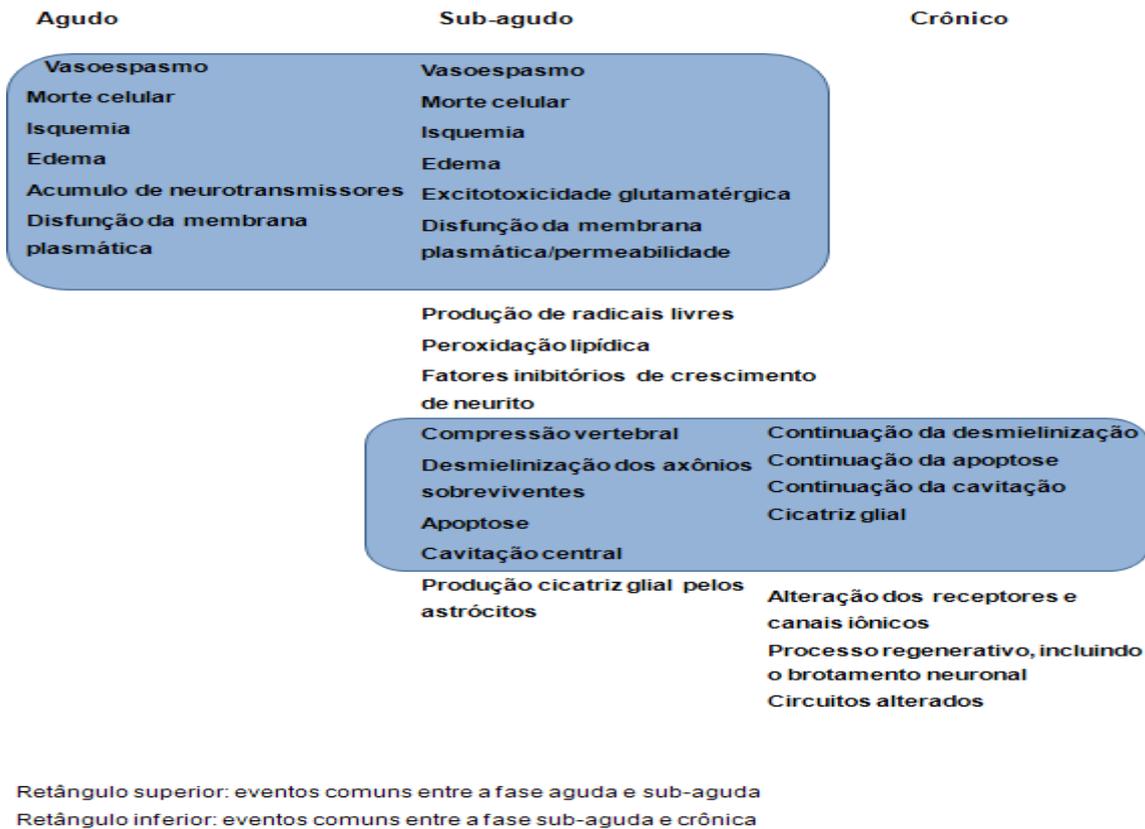


Figura 3. Principais características das três fases da lesão medular no tecido (adaptado de OYINBO, 2011).

Em modelo de lesão medular por contusão no rato, a morte celular atinge o seu pico máximo após uma semana da lesão e continua ao longo do primeiro mês (LI; FIELD; RAISMAN, 1999). A maioria dos estudos em lesão medular com humanos define a intervenção precoce como sendo a intervenção realizada com menos de 72 horas, período em que a lesão secundária ainda não está completa (MIRZA *et al.*, 1999).

1.2 Treino locomotor em esteira

A melhora na capacidade locomotora tem se mostrado como um resultado do treinamento, não necessariamente através da melhora da atividade muscular voluntária, mas devido ao padrão de atividade gerada pela marcha em esteira, fornecendo o apropriado retorno proprioceptivo, em humanos (WERNING *et al.*, 1995). Esta capacidade locomotora que independe ou depende parcialmente da capacidade de contração muscular voluntária, pode estar presente em humanos, e é de máxima importância ter uma boa perspectiva com relação ao tratamento,

fornecendo um bom aporte aferente, pois, a aplicação das aferências pode influenciar na ativação de circuitos neuronais localizados na medula espinhal e conseqüentemente influenciar a função (VAN de CROMMERT *et al.*, 1998).

O treino locomotor em esteira é baseado em estudos com gatos que apresentam lesão medular e que após várias semanas de treinamento em esteira, recuperam a sua habilidade de dar passos (BARBEAU; ROSSIGNOL, 1987; DE LEON *et al.*, 1998; LOVELY *et al.*, 1986). O treinamento em esteira é uma intervenção que não fornece somente a prática motora, mas também aferências sensoriais (GRILLNER, 1979; PEARSON; ROSSIGNOL, 1991).

A partir desta ideia, surge o conceito do gerador de padrão central (CPG), que consiste de uma rede funcional de neurônios localizados em diferentes partes do sistema nervoso central, que gera potenciais rítmicos e padronizados (DUYSENS, VAN de CROMMERT, 1998), como exemplo: o ato de caminhar. O controle da locomoção, em humanos, depende das informações aferentes de variadas fontes, como os sistemas visual, vestibular e proprioceptivo, fontes que são utilizadas pelo CPG (DIETZ, 2002).

Para confirmar a hipótese da existência do CPG, estudos experimentais com animais, principalmente em gatos com lesão completa, após serem submetidos a protocolos de treinamento em esteira, recuperam sua função locomotora, sendo atribuída esta melhora ao estímulo do CPG situado em nível medular (DUYSENS, VAN de CROMMERT, 1998). Resultados confirmam a existência do CPG na medula espinhal de gatos, e que o CPG pode gerar atividade locomotora rítmica independente das vias descendentes (DE LEON *et al.*, 1998). Dietz (2002; 2003) valida a afirmativa em um estudo experimental utilizando gatos adultos, após lesão medular completa e treino em esteira, os animais apresentaram bons resultados com a recuperação da função motora dos membros posteriores. Kubasak e colaboradores (2005), utilizando roedores, demonstraram que, mesmo na ausência de regeneração axonal em toda a extensão da lesão, o treino com esteira por si só melhorou a função coordenada em ratos com lesão completa.

Um esquema do CPG pode ser visualizado na Figura 04. Resumidamente, o CPG é constituído de um gerador rítmico, que contém os centros flexores (que vão gerar um movimento com padrão flexor) e centros extensores (que vão gerar um padrão de movimento extensor). Estes centros estão inervados entre si com interneurônios inibitórios, o que faz com que quando um está ativado, o outro está

inibido. Então, se o centro extensor é ativado, irá gerar um padrão extensor, que corresponde à fase de apoio na marcha. Neste momento há informações chegando ao corno dorsal da medula espinhal com a retroalimentação do peso corporal incidente sobre o membro, posição articular, comprimento muscular e tensão tendínea, que por sua vez possuem conexões com o gerador rítmico. Assim, completando o ciclo, ativando o centro flexor e inibindo o centro extensor (Van de CROMMERT; MULDER; DUYSSENS, 1998).

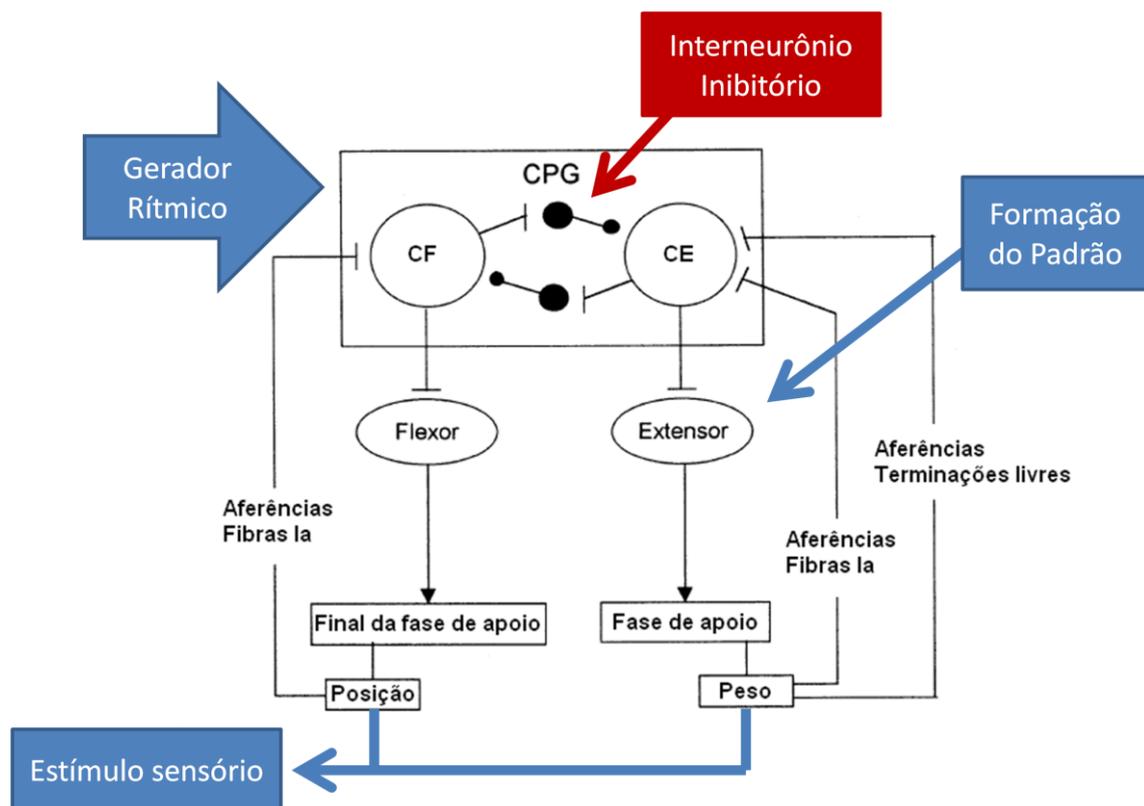


Figura 4. Esquema ilustrativo do CPG situado na medula espinhal (adaptado de Van de CROMMERT; MULDER; DUYSSENS, 1998).

Estudos clínicos em humanos paraplégicos, indicam que a eficiência do treinamento na esteira depende em grande parte da severidade da lesão. Isto porque pacientes com lesão completa nunca melhorarão até o estágio de caminharem sem assistência de algum tipo de dispositivo de suporte de peso (VAN DE CROMMERT; MULDER; DUYSSENS, 1998). Há relatos de efeitos comparativos utilizando humanos com lesão completa e incompleta (HARKEMA *et al.*, 1997), propondo que o treino em esteira com suporte de peso corporal pode ser uma

ferramenta valiosa durante a reabilitação. Estes benefícios têm sido explorados especialmente em pacientes com lesão medular incompleta (HARKEMA, 2001).

Então, da mesma forma que em gatos, a melhora na função locomotora ocorre em humanos, sendo vista em ambos os tipos de lesão medular, completa ou incompleta, quando obviamente treinados intensivamente em esteira usando suporte de peso (VAN de CROMMERT *et al.*, 1998). A utilização de suspensão de 40% do peso corporal em humanos com hemiparesia resultou em alinhamento do tronco e joelhos, diminuição no tempo de apoio duplo na marcha, aumento do comprimento e velocidade do passo (VISINTIN; BARBEAU 1989). A melhora da função também é obtida em humanos com lesão medular completa e incompleta após vários meses de treino em esteira; foram habilitados a gerar movimentos coordenados, sendo confirmado por eletromiografia (EMG) com um aumento na atividade extensora da perna (WIRZ; COLOMBO; DIETZ, 2001).

A recuperação da marcha é uma meta importante na reabilitação. Por esta razão são justificados os estudos que visam a reabilitação da marcha. Com essa visão, o treinamento da marcha com suporte de peso corporal em esteira (TESP) tem recebido uma atenção especial. O TESP é constituído de um sistema de suspensão na qual o paciente é conectado de modo que o peso corporal possa ser controlado, fornecendo variados níveis de equilíbrio e reforço ao paciente, facilitando a marcha com o auxílio de uma esteira (VISINTIN *et al.*, 1998). Deste modo, é possível que pessoas com lesão medular caminhem em uma esteira. Terapeutas ajudam na realização dos movimentos dos membros inferiores durante a deambulação e, se necessário, imitam a marcha normal. Indivíduos com lesão medular que são submetidos ao TESP têm demonstrado melhora na velocidade e duração do exercício, e alguns, em sua habilidade de deambulação (HICKS *et al.*, 2005).

Estudos com animais e humanos envolvendo treinamento da marcha em esteira é particularmente relevante pela razão neurofisiológica, uma vez que, especificamente se trata de neuroplasticidade induzida pela atividade locomotora repetida, tentando melhorar a atividade sensório-motora da marcha ao nível medular e supra-espinhal (DE LEON *et al.*, 1998). Na busca de recuperação da função motora, os estudos com animais experimentam diferentes protocolos para o treinamento em esteira, variando no tempo em que o animal se recupera após cirurgia, para que posteriormente possa iniciar o treinamento; no tempo de

exposição à esteira; na velocidade e periodicidade da abordagem, assim como o uso de suporte de peso ou não.

Sabatier e colaboradores (2008) utilizaram o treinamento locomotor três dias após cirurgia em camundongos, aplicados cinco dias por semana por duas semanas, consistindo em 1 hora de contínua locomoção em esteira, com velocidade de 0,16 m/s. Já Ogborn e Gardiner (2010) utilizaram um protocolo em que os roedores foram expostos ao treino por 10 dias, 1 vez por dia os animais recebiam 30 minutos de treino com velocidade de 0,3 m/s, sendo que o início precoce do tratamento, 72h após lesão promove a recuperação da função motora e diminuição de morte celular por apoptose (LI et al., 2013).

De acordo com Schmidt e Lee (1998) o desenvolvimento de uma atividade motora específica é o reflexo de uma aprendizagem motora, que envolve a integração das informações sensoriais e motoras. A hipótese da aprendizagem específica é dependente dos avanços da recuperação neural e da neuroplasticidade, sendo que a tarefa específica resultante da atividade leva a alterações no sistema nervoso, sendo essas alterações correlacionadas com as melhorias do comportamento motor.

1.3 Células-tronco (CT)

As terapias celulares representam uma nova e importante estratégia para o tratamento de lesões do sistema nervoso. O transplante de células neurais é mais um passo para atingir a reparação neural, afinal, a presença dos progenitores endógenos não se mostram eficientes para gerar uma significativa recuperação (HORNER; GAGE, 2000). Células periféricas como as Células de Schwann, células do bulbo olfatório, as células-tronco adultas, células do Sistema Nervoso Central (SNC) fetal e células-tronco embrionárias são fontes potenciais para o transplante celular com o objetivo de minimizar a lesão e promover a recuperação de tecidos lesados, como a medula espinhal (McDONALD; HOWARD, 2002).

A célula-tronco (CT) é uma célula indiferenciada primitiva não especializada, com a capacidade de se auto-replicar, ou seja, pode se dividir para reproduzir-se a si mesma (auto-renovação) ou dar origem a células mais diferenciadas (diferenciação) (Figura 05) (YAMASHITA *et al.* 2007). Devido a estas características, as CTs podem ser classificadas segundo sua potencialidade em toti, pluri ou multipotentes. São chamadas de totipotentes as células capazes de gerar todos os tipos celulares

embrionários e extra-embrionários; as pluripotentes podem originar todas as células que formam um embrião (propriamente dito) e são provenientes da massa interna do blastocisto (CT-embriônicas); são classificadas como multipotentes as células que originam apenas um subgrupo de linhagens celulares, por exemplo, as CT-mesenquimais (CTM) e neurais (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

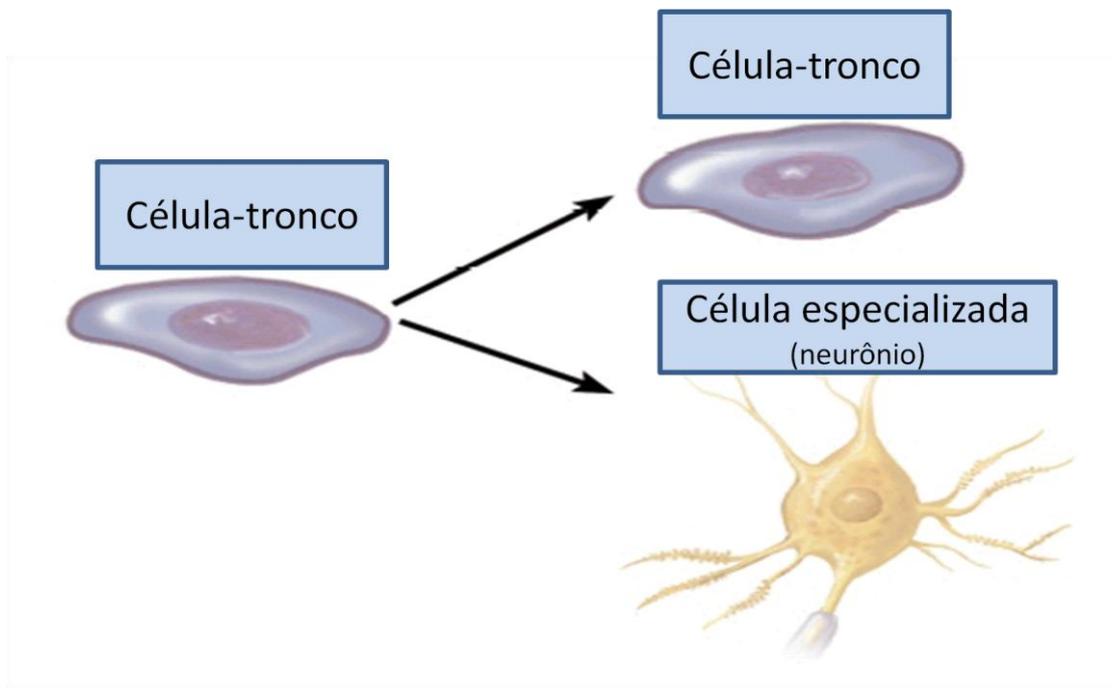


Figura 5. Desenho esquemático da auto-renovação e diferenciação de células-tronco (adaptado de ZECH, 2004). Uma célula-tronco pode se auto-renovar ou se diferenciar em células especializadas, exemplo o neurônio.

As CTs podem dar origem às células progenitoras, que são células com potencial mais restrito do que as CT. Células progenitoras comparadas com células embrionárias, são células adultas que possuem um decréscimo na habilidade de se auto-renovar e normalmente se diferenciam através de uma única linhagem de células germinativas (VERFAILLIE, 2005). As células-tronco adultas têm sido encontradas na medula óssea (BIANCO *et al.*, 1999); na córnea e retina (WU *et al.*, 2001); no cérebro (DAVIS; TEMPLE, 1994); nos músculos esqueléticos (SEALE; RUDNICKI, 2000); na pele (GANDARILLAS; WATT, 1997) e em outros locais. Existem linhagens específicas de células progenitoras que possuem a derivação de um tecido específico, por exemplo, célula-tronco mesenquimal (CTMs) de tecido adiposo, músculo ou osso; células hematopoiéticas (CTHs) de sangue ou osso; e células neurais (CTNs) derivadas do sistema nervoso (KIATPONGSAN; SIPP, 2009).

Estudos e aplicações clínicas com células embrionárias se mostram desafiadores em razão de várias controvérsias éticas e políticas em torno de sua utilização, além de seu alto potencial de gerar teratomas. Conseqüentemente, as CTs obtidas de tecidos adultos vêm sendo amplamente estudadas (SHANTI *et al.*, 2007). CTs localizadas em tecidos que se renovam continuamente como a pele ou medula óssea são hábeis para regenerar ou reparar esses tecidos durante a vida toda (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2003). No SNC, as células-tronco neurais tem pobre capacidade para gerar novos neurônios ou oligodendrócitos para reparar a perda celular após injúria ou degeneração (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2003). Assim, em desordens do sistema nervoso, nas quais ocorre perda celular neuronal específica, o transplante de células progenitoras, células neurais, induz a recolocação da perda celular e recuperação de algum grau de função (FREED *et al.*, 2001).

Um dos locais mais utilizados para extração de CT-adultas é a medula óssea, amplamente estudada. Nesse tecido encontramos dois tipos de CT: as hematopoiéticas e as mesenquimais (CTM) (BONILLA *et al.*, 2005). As CTM foram primeiramente reconhecidas por Friendstein e colaboradores (1968) na medula óssea, por sua habilidade em formar colônias de fibroblastos e se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos. São encontradas em diferentes tecidos, recentemente tem-se estudado as células-tronco mesenquimais de polpa de dente decíduo (SHEDs), que são localizadas na cavidade central do dente, onde contém o tecido pulpar, sendo considerada uma fonte de células progenitoras/tronco que pode se proliferar e se diferenciar em diferentes linhagens celulares *in vitro* (GRONTHOS *et al.*, 2000, 2002), incluindo células neurais (MIURA *et al.*, 2003). As células mesenquimais são uma fonte de células-tronco e células progenitoras que, quando aplicadas em tecido de um hospedeiro, mostram serem capazes de se diferenciar em neurônios. Assim, CTMs têm sido testadas como um agente terapêutico para a reparação do tecido nervoso lesado (LI *et al.*, 2001).

A célula-tronco mesenquimal representa uma ferramenta promissora de um novo conceito clínico na terapia celular. CTMs são células indiferenciadas, que tem a habilidade de se auto-renovar e alta capacidade de proliferação. Estas células compreendem uma rara população multipotente. Vários estudos sugerem que, CTMs são capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, incluindo condrócitos, osteócitos, adipócitos, miócitos e neurônios (ZUK *et al.*, 2002; KERN *et al.*, 2006).

Para McDONALD e colaboradores (2004), uma das possíveis abordagens para a reparação da lesão medular é através do uso de células-tronco. CTM é uma fonte atrativa para o uso no transplante celular, devido a facilidade de obtenção, expansão e habilidade em atingir o local de lesão; e a estratégia de transplante celular para fornecer mielinização axonal e melhorar a remielinização é bem justificada para a reparação da medula espinhal (CAO *et al.*, 2005).

1.3.1 Prováveis mecanismos de ação

Experimentos para o tratamento do trauma no SNC podem ser amplamente agrupados em duas distintas, mas inter-relacionadas estratégias de “neuroproteção” e “neuroreparação/neuroregeneração”. Enquanto que neuroproteção se refere à inibição da morte das células do parênquima do SNC seguida do trauma, neuroreparação se refere à regeneração dos axônios lesados ou brotamento, plasticidade dos axônios intactos. CTMs têm sido usadas para ambas as estratégias. Como exemplo, o estudo de Dasari e colaboradores (2007a) que utilizaram o transplante de células-tronco uma semana após a lesão medular por contusão em ratos, que resultou em diferenciação das células em células neurais, exibindo o perfil morfológico e imunoistoquímico dos neurônios, oligodendrócitos e astrócitos, auxiliando na remielinização de neurônios desmielinizados. Uma diminuição na regulação de moléculas apoptóticas e um aumento na regulação em moléculas anti-apoptóticas (Figura 06) tem sido relatado pelo mesmo grupo de pesquisadores, após o transplante de células mesenquimais de medula óssea em ratos com lesão medular por compressão (DASARI *et al.*, 2007b).

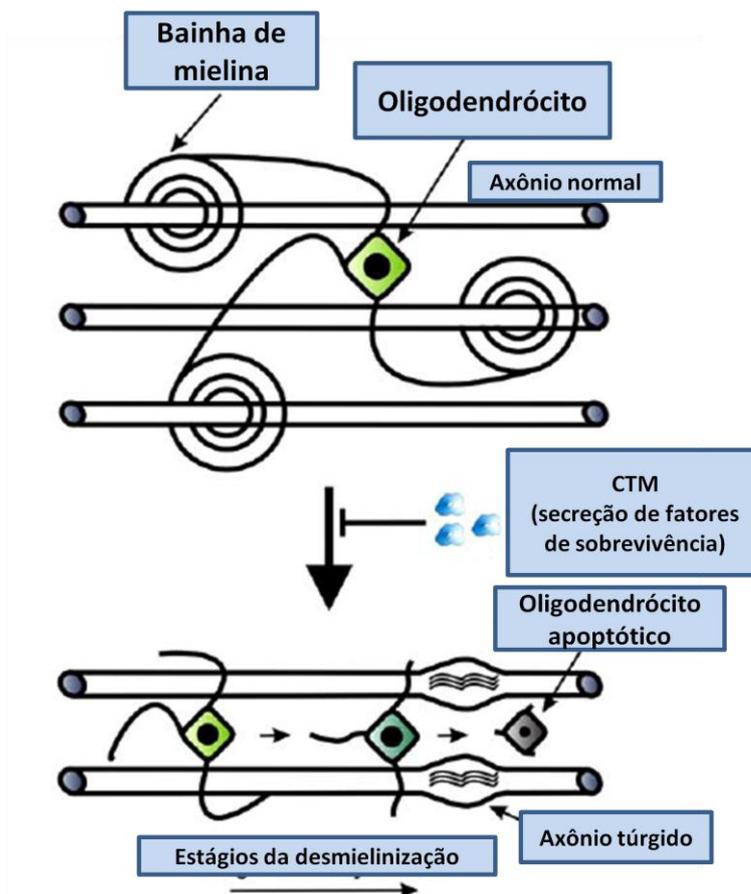


Figura 6. Prevenção da apoptose do oligodendrócito pelas CTMs. O transplante de CTM pode reduzir a apoptose de oligodendrócitos seguido da injúria do SNC através da secreção de fatores de sobrevivência como o fator de crescimento insulínico. Resulta em redução da desmielinização dos axônios intactos, decorrente dos mecanismos da lesão secundária, no qual o oligodendrócito retrai seus processos, se tornando atrofiado e posteriormente sofrendo apoptose. Os axônios desmielinizados devido a degeneração desenvolvem axônios túrgidos (adaptado de AZARI *et al.*, 2010)

Uma vez no local de lesão, as CTMs podem secretar pró-fatores de sobrevivência como fator de crescimento insulínico (insulin-like growth factor – IGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (brain derived neurotrophic factor – BDNF), fator de crescimento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor – VEGF), fator de crescimento fibroblástico 2 (fibroblast growth factor-2 – FGF2) e fator de transformação do crescimento (transforming growth factor - beta – TGF β) (NAKAGAMI *et al.*, 2005; SADAT *et al.*, 2007).

Em outro estudo experimental, as CTM sobreviveram após o enxerto em tecido medular, formando pontes celulares dentro da cavidade no centro da medula lesada. Neste tecido foi mostrada a marcação positiva para neurônios e astrócitos, juntamente com o marcador de proliferação ependimal, mostrando nestina positivo,

indicativo de células progenitoras (ZURITA; VAQUEIRO, 2004). Estas células em cultura na presença de BDNF expressam nestina, GFAP (glial fibrillary acidic protein) e NeuN (neuron-specific nuclear protein) (SANCHEZ-RAMOS *et al.*, 2000). A adição de AMP em cultura tem resultado em indução da diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em células neurais progenitoras (DENG *et al.*, 2001). Anticorpos são utilizados para identificar a diferenciação das CTs, como GFAP para astrócitos, O4 e NG2 para oligodendrócitos (ERCEG *et al.*, 2010), facilitando a compreensão da possível regeneração/reparação.

Hutchinson e colaboradores (2004), em um estudo com animais, mostraram que o desuso da musculatura após a lesão medular, reduz os níveis de proteínas e mRNA do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) na medula espinhal lombar e na musculatura do sóleo, em ambos os estágios agudo e crônico após a lesão medular. A lesão medular em modelo animal promove redução na função de vários músculos, sendo que o principal dano é visto em músculos posturais, nos quais predominam as fibras do tipo 1. (LIU, 2006). Essas alterações podem ser minimizadas através do transplante de células, pois além da sobrevivência, diferenciação, e outros mecanismos (SAKAI *et al.*, 2012), podem proporcionar a neuroproteção e neuroregeneração, sendo que o transplante de células está relacionado com a recuperação da função motora de animais submetidos à lesão medular (CAO *et al.*, 2005). Cao e colaboradores (2001) após o transplante de células progenitoras neurais no local de lesão de ratos com lesão medular favoreceu a diferenciação em astrócitos. Portanto, o transplante de células se mostra justificável pela possível diminuição dos efeitos deletérios após lesão.

1.4 Justificativa

Diversas abordagens experimentalmente já foram testadas, mas nenhuma capaz de reverter totalmente o déficit causado pela lesão medular. O treino locomotor é capaz de melhorar a condição funcional, além de estimular a liberação de fatores de crescimento, que podem estar atuando diretamente na medula dos animais lesados, favorecendo a recuperação. Mas ainda há a necessidade de esclarecimentos quanto à utilização desta abordagem, já que a neurobiologia desta intervenção ainda não é totalmente conhecida.

As células-tronco têm sido estudadas como uma alternativa terapêutica, estando associada a resultados promissores após a lesão medular tanto quanto à

recuperação da função motora, como em relatos de diferenciação celular em neurônios, oligodendrócitos e astrócitos após o transplante. As células-troncos, mesmo não se diferenciando em células neurais, são capazes de secretar citocinas e fatores neurotróficos, que são capazes de interferir positivamente na recuperação da medula lesada.

A combinação dos tratamentos envolvendo células-tronco e o treino em esteira, até o momento não foi relatada. Portanto este estudo contribui para o esclarecimento da resposta neurobiológica das diferentes abordagens e da combinação entre os tratamentos.

1.5 Hipótese

O transplante de células-tronco associado com treino locomotor é mais eficaz na recuperação da função motora de animais submetidos à lesão medular experimental, do que os tratamentos isolados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar se o tratamento de células-tronco combinado com o treinamento locomotor é mais eficaz do que os tratamentos isolados na recuperação da função motora.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a recuperação da função motora espontânea ou facilitada após o transplante de células-tronco, treinamento em esteira ou associação de células com treinamento em esteira, comparativamente, em ratos Wistar submetidos à lesão medular traumática.

- Verificar alterações na área de cavitação do tecido, comparativamente, nos diferentes grupos submetidos à lesão medular traumática, através do método de coloração por violeta de cresil.

- Investigar a sobrevivência e a diferenciação das células transplantadas em neurônios e astrócitos, comparativamente, nos grupos submetidos ao transplante, utilizando a técnica de co-localização em microscopia confocal.

- Investigar a intensidade de GFAP+ na medula espinhal, comparativamente, nos grupos submetidos à lesão medular.

- Investigar a intensidade de NF-M na medula espinhal, comparativamente, nos grupos submetidos à lesão medular.

- Identificar o tratamento mais eficaz para a lesão medular experimental em ratos Wistar submetidos à lesão medular traumática.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 70 ratos machos *Wistar* adultos (incluso o total em perdas por mortalidade de 28%) provenientes do Biotério setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pesando entre 200 e 300 gramas, com 90 dias de vida ao início dos experimentos. Os animais permaneceram em grupos de 5 em caixas *Plexiglass* (42x34x18) em condições padrão (ciclo de 12 h claro/escuro), controle da temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$), água e comida fornecidas à vontade, mantidas no biotério do departamento de Bioquímica.

Uma semana antes da cirurgia os animais foram distribuídos randomicamente nos diferentes grupos experimentais. Os animais que receberam tratamento com treino locomotor em esteira foram adaptados à mesma, sendo utilizada a velocidade de 0,3 m/s, 1 vez por dia, cinco dias da semana por 20 minutos cada sessão. Dois dias antes a cirurgia, os animais foram submetidos à primeira avaliação da função motora (através do campo aberto, juntamente com a escala de BBB descrita no item 3.7). Foram estabelecidos os seguintes grupos:

- Grupo I (grupo Sham) - animais submetidos à laminectomia sem lesão medular (n=10);
- Grupo II (Lesão) – animais submetidos à laminectomia com lesão medular (n=10);
- Grupo III (SHEDs) – animais submetidos à laminectomia com lesão medular que receberam a aplicação de células-tronco 1h após lesão (n=10);
- Grupo IV (Treino) – animais submetidos à laminectomia com lesão medular que receberam treinamento locomotor a partir terceiro dia após lesão (n=10);
- Grupo V (SHEDs +Treino) – animais submetidos à laminectomia com lesão medular que receberam células 1h após lesão e treinados em esteira a partir do terceiro dia após cirurgia (n=10);

A avaliação funcional motora foi realizada 2 dias antes, e 2 dias após a cirurgia bem como semanalmente até a sexta semana. A partir do terceiro dia após cirurgia, os animais que receberam tratamento com treinamento em esteira, receberam 1 sessão de treino de 0,3 m/s por 20 min em cinco dias por semana, até

a sexta semana. Ao término da sexta semana, todos os animais foram perfundidos, e os tecidos armazenados para posterior análise.

Todos os procedimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado pela *National Institute of Health – USA* (NHI). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob o número 22249/2011 - CEP UFRGS.

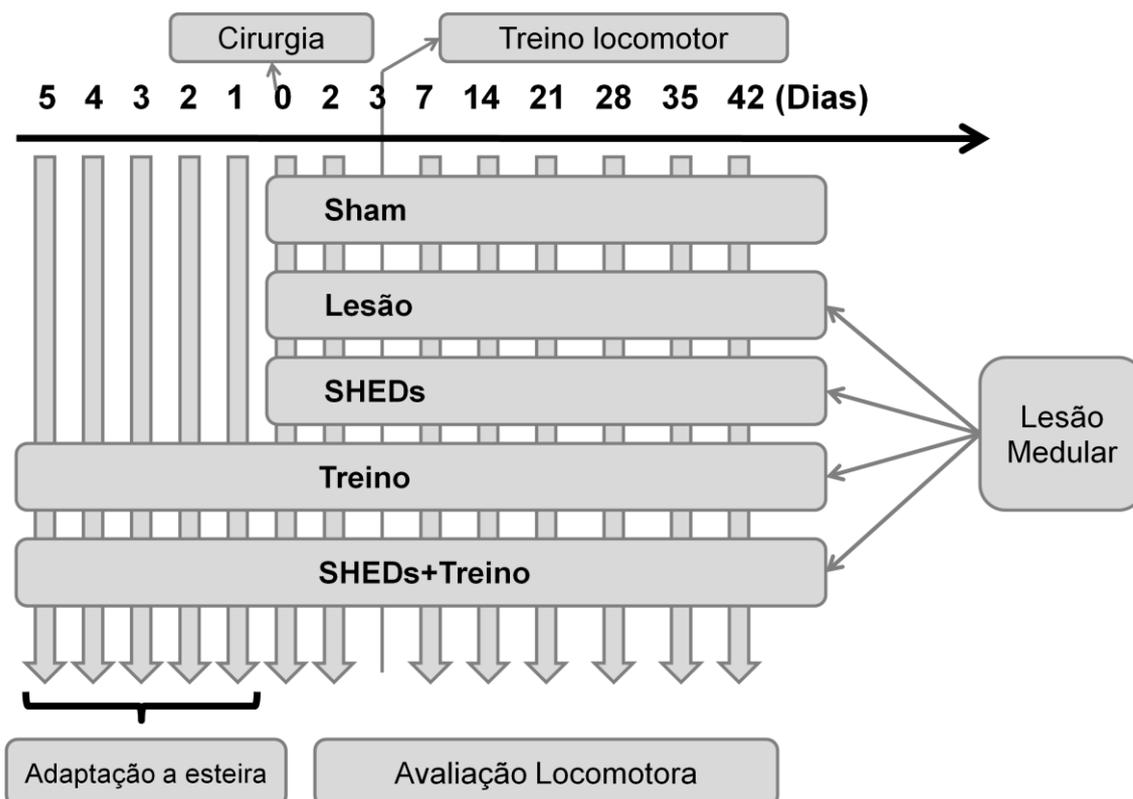


Figura 7. Desenho experimental. Representação dos grupos e intervenções ao longo do estudo.

3.2 Lesão medular traumática

Todos os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/kg, i.p.) e Xilazina (5 mg/kg i.p.) previamente a cirurgia de laminectomia conforme descrito por Dasari e colaboradores (2008) e, então, submetidos à tricotomia.

Para o procedimento de laminectomia, o animal foi posicionado em decúbito ventral e uma incisão de aproximadamente 5 cm de pele e tecido subcutâneo sob a linha média da região dorsal, expondo a região da coluna vertebral entre T8 e T12 e os músculos paravertebrais que se inserem entre T9 e T11 foram dissecados. Após essa exposição, a lâmina da vértebra T10 e a metade distal do processo espinhoso de T9 foram removidas, sem lesão de T8 ou da medula espinhal, com o uso de um microscapa-bocados.

A lesão medular traumática, ao nível de T10, foi realizada por contusão, através do *New York University impactor (NYU impactor)* descrito por Gruner (1992) (Figura 08). A partir da queda de uma haste com peso de 10 g são reproduzidos diferentes graus de lesão, sendo consideradas as alturas de 6,5 ou 12,5 mm, lesões discretas, de 25 mm, lesão moderada, ou 50 mm, lesão grave. Neste estudo foi realizada uma lesão moderada provocada pela queda da haste da altura de 25 mm (Figura 09), sobre a medula exposta após laminectomia entre T9-T10 (RODRIGUES *et al.*, 2012). Este é um dos métodos mais empregados na literatura devido a sua reprodutibilidade (McDONALD; HOWARD, 2002; McDONALD *et al.*, 2004).

Após a lesão medular por trauma, os animais foram suturados, acondicionados isoladamente nas caixas, mantidos nas mesmas condições de temperatura e controle de luz. Todos os animais receberam 0,1 mL de Enrofloxacino (Bayer, Brasil) para as infecções do trato urinário por 5 dias após a lesão, não sendo utilizado analgésico no pós-operatório. Os animais foram submetidos à compressão vesical manual, de uma a duas vezes ao dia, pelo método de Crede, por 5 dias ou até adquirirem o controle voluntário desta função. A partir do terceiro dia os animais foram agrupados em caixas, com no máximo 5 animais por caixa.



Figura 8. NYU Impactor.

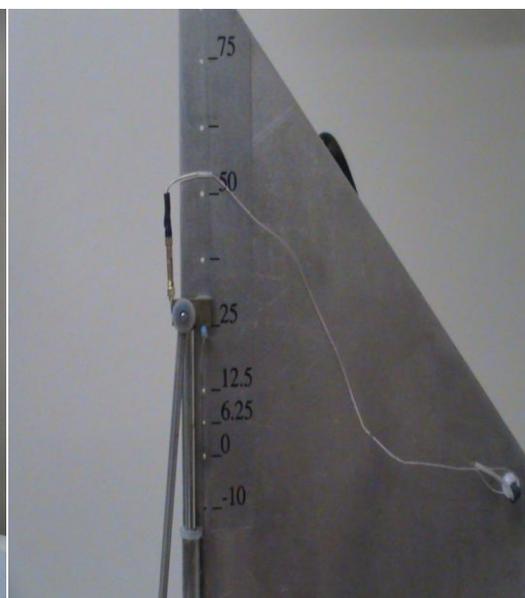


Figura 9. Alturas da haste.

3.3 Obtenção das células-tronco mesenquimais de polpa de dentes humanos decíduos

As células-tronco mesenquimais foram obtidas da polpa de dentes decíduos humanos. Os responsáveis pelos pacientes assinaram um termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul registrado sobre o numero 296/08 (Anexo A).

A manipulação dos dentes decíduos (ou dentes de leite) após a extração (realizado por um odontólogo) e dos fragmentos de tecido pulpar deles removidos foram realizadas orientados pelo processamento descrito por Luisi e colaboradores (2007). Seguindo esta metodologia, após coletado, o dente foi colocado em um frasco contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium, Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, USA), 100 unidades/mL de penicilina (Gibco, USA), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, USA) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (fungizone, Gibco, USA) para transporte até uma capela de fluxo laminar, sob condições estéreis. Na capela de fluxo laminar, todo o tecido pulpar remanescente (polpa coronária e radicular, se presente) foi separado do elemento dentário de acordo com o grau de raiz residual do dente. Caso a câmara pulpar esteja aberta, permitindo o acesso de instrumental, a remoção foi realizada com uma colher de dentina ou com o auxílio de um extirpa nervo (KERKIS *et al.*, 2006) ou se este acesso estivesse impossibilitado, foi realizada a clivagem do dente, que expõe a polpa na sua totalidade. Se houvesse a necessidade, a preparação da clivagem poderia ser realizada imediatamente após a extração do dente por meio da confecção de três canaletas, duas no sentido longitudinal do dente e uma perpendicular a estas duas, unindo-as na coroa. Já na capela de fluxo laminar, o dente previamente preparado foi firmemente apreendido e clivado com o auxílio de uma espátula de inserção. A polpa exposta foi totalmente removida com o auxílio de uma colher de dentina.

O tecido obtido foi incubado a 37°C, por 1h, em tampão contendo 0,2% de collagenase tipo I (Gibco, USA), 25mmol/L HEPES (N-2 Hidroxietil piperazine – N'-2 ácido sulfônico etano pH7,4, Gibco, USA), 10 mmol/L de fosfato de sódio mono-básico (Nuclear, Brasil), 100 mmol/L de cloreto de sódio (Dinâmica, Brasil), 3 mmol/L de fosfato de potássio, 1 mmol/L de cloreto de cálcio (Synth, Brasil), 24 mmol/L de

cloreto de potássio (Synth, Brasil), 0,5% de glicose (Sigma-Aldrich, USA), 12 mmol de manitol (Synth, Brasil), 0,2% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, USA), 45 µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plough). Para a suspensão de células se utilizou de centrífuga à 800 g por 10 minutos a 4°C. O material resultante foi ressuspensão em meio DMEM (Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, USA), 100 unidades/mL de penicilina (Gibco, USA), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, USA), 0,45 µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plough) e 3,7 mg/L de HEPES (Gibco, USA). A ressuspensão foi realizada em garrafas de cultura plástica de 75 cm² e estas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO² a 95% de ar a 37°C. As células de cada poço foram mantidas em culturas monocamada. O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias. Quando as células mostraram-se confluentes foi realizado o repique (passagem) destas células para novas garrafas de cultivos, sendo que para isso as células em cultura foram colhidas com solução de tripsina-EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich, USA) e transferidas para subculturas na razão de 1:3, no respectivo meio de cultivo. Após nova confluência, as células foram novamente repicadas, ou seja, alocadas em novas garrafas na mesma razão de 1:3 até a 10^a passagem quando foram utilizadas no modelo de lesão medular.

Estas células foram recebidas do Laboratório de Hematologia e Células-Tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS prontas para a utilização.

3.4 Caracterização imunofenotípica e pluripotência das células-tronco mesenquimais de dente decíduos

A análise pela citometria de fluxo foi realizada nas culturas de células na 5^a passagem (n=3) (BERNARDI et al., 2011). Um total de 106 células foram incubadas com os seguintes anticorpos de superfície: CD44, CD73, CD90, CD29 (marcadores positivos para células-tronco mesenquimais), e, CD14, CD34, CD45, CD184, HLA-DR e o marcador STRO-1 (marcadores negativos para células-tronco mesenquimais) (PharMingen-BD Biosciences, San Diego, CA), conjugado com FITC (Santacruz, Santa Cruz, CA), ou PE (PharMingen-BD Biosciences, San Diego, CA). A aquisição de dados foi realizado usando o equipamento FACSAria III flow cytometer (BD Biosciences), e 10,000 eventos foram analisados utilizando o software FACS Diva 6.1.3 (BD Biosciences). As células foram cultivadas em meios

indutores apropriados para avaliar a sua capacidade de diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica segundo Bernardi e colaboradores (2011).

3.5 Transplante de células-tronco na lesão raqui-medular

Os animais foram tratados com células-tronco mesenquimais de dente decíduo de humanos (SHEDs), injetadas 1h após lesão no local da lesão na medula espinhal. Os animais permaneceram anestesiados durante este período (cirurgia e transplante de células).

Foi administrado $0,3 \times 10^6$ de SHEDs suspensas em NaCl a 0,9% diluídas em 10 μ l de salina, que foram aplicadas no local da lesão (administração local) 1h após lesão. Todos os animais foram mantidos vivos por 6 semanas após a infusão das células-tronco. Os demais animais dos outros grupos também foram mantidos vivos por 6 semanas (RODRIGUES et al., 2012).

3.6 Protocolo de treino locomotor em esteira

O protocolo de treinamento em esteira foi realizado em esteira ergométrica adaptada para ratos INSIGHT® (Figura 10).

Os animais dos grupos SHEDs+Treino e Treino Locomotor, receberam um período de adaptação a esteira 1 semana antes da cirurgia com velocidade de 0,3 m/s por 20 min, 1 sessão por dia por 5 dias. Esses mesmos grupos, 3 dias após a lesão, foram submetidos ao treinamento em esteira de 0,3 m/s durante 20 min, 1 sessão por dia 5 dias por semana, até completar as seis semanas (ANDRADE; MENDONÇA; CHADI, 2010).



Figura 10. Esteira ergométrica para ratos INSIGHT®.

3.7 Avaliação da recuperação motora

Os déficits funcionais e a recuperação motora foram avaliados através da função motora dos membros posteriores com o uso dos vídeos gerados da atividade locomotora em campo aberto (Figura 11) pela escala de Basso, Beatie e Bresnahan (B.B.B.), descrita por Basso, Beatie e Bresnahan (1995) (Anexo B). A escala tem 22 valores que vão de 0 (paralisia total) a 21 (locomoção normal).

A pontuação da escala foi realizada através de filmagem, 1 animal por vez que foi filmado por um período de 2 minutos em campo aberto, logo após, os vídeos foram analisados por 2 avaliadores “cegos” quanto ao tratamento recebido pelos animais. Estas avaliações em campo aberto foram realizadas 2 dias antes da lesão, 2 dias depois e semanalmente por 6 semanas.



Figura 11. Campo aberto circular para a análise da atividade locomotora avaliada pela escala de BBB.

3.8 Análise morfológica

3.8.1 Perfusão

Todos os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina nas mesmas doses utilizadas na cirurgia (item 3.2), no final da 6^o semana, realizando-se posteriormente a toracotomia com exposição do coração. A seguir, foram injetadas 1000 UI de heparina sódica no ventrículo esquerdo, e por meio de uma incisão neste mesmo ventrículo foi inserida uma cânula ligada a uma bomba de perfusão (Control Company). Após uma segunda incisão, desta vez, no átrio direito, foi perfundida, inicialmente, uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) (150 ml), para

lavagem da árvore vascular e, posteriormente, uma solução fixadora (300 ml) composta de paraformaldeído (PFA) (Reagen, Brasil) 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M pH 7,4. Após esse procedimento, a medula espinhal foi removida, entre C5 a L5, sendo pós-fixados na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão, por 4 horas à temperatura ambiente (MESTRINER *et al.*, 2011).

Posteriormente, as medulas espinhais foram crioprotégidas pela imersão em sacarose 15% diluída em TF a 4°C, onde permaneceram até submergirem, após, foi trocada a solução de sacarose, sendo esta de 30% diluída em TF a 4°C, onde, novamente permaneceram até submergirem. Depois de realizar a crioproteção, as medulas foram congeladas em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -70°C.

3.8.2 Análise da área de cavitação

Para analisar a área de cavitação, aproximadamente 60 secções longitudinais no sentido coronal, com espessura de 30 µm de cada medula de todos os animais foram processadas em criostato (Leica, Germany). Posteriormente, esses cortes foram corados com a técnica de Violeta de Cresil. Para a validação, secções sequenciais com um intervalo de 150 µm entre cada corte foram escolhidas, sendo que a área de cavitação de cada uma foi calculada para encontrar o corte com a maior área de cavitação (nomeado como epicentro), a partir do epicentro foram escolhidas 5 secções (modificado de MENEZES *et al.*, 2010) (2 cortes acima, 2 cortes abaixo e o epicentro (150 µm entre cada secção)). A área de cavitação foi mensurada através do *software* Image J (USA) version 1.46. Todo e qualquer tipo de tecido necrótico dentro da cavidade foi contabilizado como parte da lesão. Assim, a área total de cada secção foi medida (PARR *et al.*, 2008).

3.8.3 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi realizada utilizando-se de secções longitudinais no sentido coronal das medulas espinhais. Resumidamente, os cortes das medulas em espessura de 30 µm foram fixadas em PFA (Reagen, Brasil) 4%, lavadas em PBS e, após, bloqueadas por 30 min em uma solução contendo 3% de soro normal de cabra (NGS) (Sigma-Aldrich, USA) diluídos em PBS Triton-X à 0,3% (PBS-Tx) em temperatura ambiente (CENTENARO *et al.*, 2011). Em seguida, as secções foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-núcleo humano

(anti-HuNu 1:100, Millipore-Chemicon) para a identificação das SHEDs, anti-GFAP (1:200, Sigma-Aldrich) para a identificação de astrócitos, anti-NF-M (1:500 AbD Serotec) para a identificação de axônios de neurônios, diluídos em PBS-Tx e NGS e mantidas em câmara fria (4°C). No dia seguinte, as secções foram lavadas em PBS e incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes compatíveis (Alexa-Flúor, Molecular Probes), diluídos em PBS-Tx e NGS por 2 horas em uma sala escura (temperatura ambiente), seguida de lavagem em PBS. As marcações foram realizadas da seguinte forma:

- 1) Dupla marcação anti-HuNu (produzido em camundongo; 1:100, Millipore-Chemicon) para a identificação de núcleo humano e anti-GFAP (produzido em coelho; 1:200, Sigma-Aldrich) para a identificação de astrócitos.
- 2) Dupla marcação anti-HuNu (produzido em camundongo; 1:100, Millipore-Chemicon) para a identificação de núcleo humano e anti-NF-M (produzido em coelho; 1:500 AbD Serotec) para a identificação de axônios de neurônios.
- 3) Para os animais que não foram submetidos ao transplante de células, foram incubados apenas os anticorpos anti-GFAP (produzido em coelho; 1:200, Sigma-Aldrich) e anti-NF-M (produzido em coelho; 1:500 AbD Serotec), em lâminas diferentes.

Depois disso, as lâminas foram cobertas com meio de montagem PVA-DABCO (Fluka Analytical) e lamínulas. Para o controle negativo, alguns cortes foram incubados apenas com os anticorpos secundários. Todas as amostras foram processadas concomitantemente e incubadas durante o mesmo tempo médio. Decorrido o procedimento acima descrito, se utilizou de microscópio confocal (Olympus FV1000) para a visualização das marcações fluorescentes e captura das imagens (SAKAI et al., 2012).

3.8.4 Quantificação da imunofluorescência

Para comparar quantitativamente a marcação de imunofluorescência para as marcações de GFAP e NF-M, nós escolhemos o corte coronal com maior área de cavitação como referência (epicentro) e, então incluímos um corte acima e um corte abaixo para a análise de intensidade de fluorescência. Uma área de interesse foi estipulada (3800 μm^2), e para a análise da intensidade de GFAP+, foram utilizados 3 cortes de cada medula, capturadas 4 imagens de cada corte ao redor da lesão, 5 animais foram analisados para cada grupo, totalizando 240 imagens para os 4

grupos que foram submetidas à lesão medular. Para a análise de NF-M a mesma área de interesse foi estipulada, 5 animais por grupo foram analisados, 3 cortes de cada animal, 1 imagem foi gerada de cada corte no epicentro da lesão, totalizando 60 imagens para os 4 grupos que receberam apenas lesão medular.

Após a captura, as imagens foram analisadas com o programa Image J *software* v.1.46 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), onde o valor da densidade integrada por unidade de área foi obtida. Os valores das áreas de interesse de cada imagem foram utilizadas para obter a intensidade de coloração média de GFAP e NF-M para cada secção, se utilizando da densidade integrada (dado gerado pelo programa) / área de interesse ($3800 \mu\text{m}^2$), se obteve a intensidade de fluorescência. Assim, se fez a média de cada secção e de cada animal, para posterior análise estatística (JEONG et al., 2012).

3.9 Análise estatística

Os dados são apresentados como médias e as barras representam o erro padrão. A análise estatística da recuperação da função motora foi avaliada pela escala do BBB foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni para verificar a significância estatística de cada grupo. Para comparações simples entre grupos, ANOVA de uma via foi utilizada, seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni. A significância foi assumida quando o $p \leq 0,05$. Todos os dados analisados se mostraram paramétricos pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. A análise foi efetuada utilizando o software SPSS Statistics v.19 (IBM, United States).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais de polpa de dente decíduo (SHEDs)

Para a caracterização das células-tronco mesenquimais de polpa de dente utilizamos a análise de citometria de fluxo, a qual demonstrou que as SHEDs expressam um conjunto de marcadores de superfície celular de células-tronco mesenquimais (MSC) (CD44, CD73, CD90, CD29), com uma porcentagem acima de 92,2 % de células positivas para estes marcadores. Poucas células expressam os marcadores negativos para células-tronco mesenquimais (HLA-DR, STRO-1, CD14, CD34, CD45, CD184), variando de 0 a 3,00 % (Tabela 1). Além da caracterização por citometria de fluxo, as SHEDs foram postas em cultura para verificar a diferenciação celular, característica das células-troncos mesenquimais. As SHEDs se diferenciaram em adipócitos, condrócitos e osteoblastos como previamente descrito (BERNARDI et al., 2011, dados não apresentados).

Tabela 1

Citometria de fluxo das SHEDs

| | SHEDs (n=3) | |
|-----------------------------|--------------|------|
| | Positivo (%) | DP |
| Marcadores de MSC | | |
| CD44 | 92,2 | 6,7 |
| CD73 | 99,3 | 0,46 |
| CD90 | 99,2 | 0,72 |
| CD29 | 98,2 | 2,36 |
| Marcadores negativos | | |
| HLA-DR | 0,4 | 0,35 |
| STRO-1 | 0,8 | 0,26 |
| CD14 | 3,00 | 2,85 |
| CD34 | 0,2 | 0,23 |
| CD45 | 0,2 | 0,20 |
| CD184 | 0 | 0 |

Tabela 1. Caracterização das células mesenquimais por citometria de fluxo.

4.2 Avaliação comportamental – locomotora

Neste estudo foram acompanhados 70 animais, divididos em 5 grupos experimentais (Sham, Lesão, SHEDs, Treino Locomotor, SHEDs+Treino). Todos os

animais foram avaliados funcionalmente (escala BBB) 2 dias antes da lesão medular, 2 dias depois, e semanalmente até a 6^o semana após a cirurgia.

O resultado da avaliação locomotora é apresentado na Figura 12. Os animais do grupo Sham (controle cirúrgico) foram diferentes significativamente dos animais que sofreram lesão medular, a partir do segundo dia após cirurgia (dia 2) ($p < 0,05$). Isso mostra que todos os animais que foram submetidos à lesão medular apresentam uma importante alteração motora e, que os animais do grupo Sham, os quais apenas sofreram cirurgia e laminectomia, não demonstraram alterações ou qualquer déficit locomotor.

O modelo de lesão medular moderada provocado pelo equipamento *NYU Impactor* permite que os animais apresentem um grau de recuperação espontânea, assim, os animais lesados foram gradualmente recuperando o desempenho locomotor das patas posteriores. Ao término da sexta semana, o grupo lesão apresentou pontuação média de 11,31 pontos. Nesta fase os animais se locomovem, são capazes de dar passos, mas ainda de forma não coordenada.

O grupo tratado com SHEDs, a partir da primeira semana (11,06 pontos) após cirurgia apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo Lesão (4,75 pontos) no mesmo período, permanecendo diferente até o final da sexta semana. A pontuação média máxima atingida pelo grupo tratado com células foi de 15,25 pontos na sexta semana. O que confere a estes animais, se locomover de forma coordenada entre membros anteriores e posteriores, mas ainda com dificuldades, como eventualmente arrastar os dedos no chão ao longo do passo. Este fato demonstra uma aceleração do processo de recuperação após lesão medular, quando esses animais são tratados com SHEDs.

Os animais que receberam o tratamento com treino locomotor apresentaram uma recuperação da função motora próxima à atingida pelos animais do grupo lesão, não havendo diferença significativa. Ao final da sexta semana, esses animais tratados apenas com treino locomotor foram avaliados e pontuados, atingindo a média de 12,9 pontos. Os animais que apresentam essa pontuação são capazes de caminhar com coordenação entre membros posteriores e anteriores de maneira frequente.

A combinação de tratamentos, SHEDs e treino locomotor, teve sua recuperação motora significativamente superior quando comparado com os animais apenas lesados, atingindo na primeira semana após cirurgia 9,3 pontos,

permanecendo diferente do grupo lesão até o término da sexta semana, onde a média de 13,95 pontos foi registrada.

Quando os três grupos que receberam tratamento foram comparados, não apresentaram diferença. Mas notavelmente o grupo tratado com SHEDs obteve o melhor desempenho na recuperação da função motora.

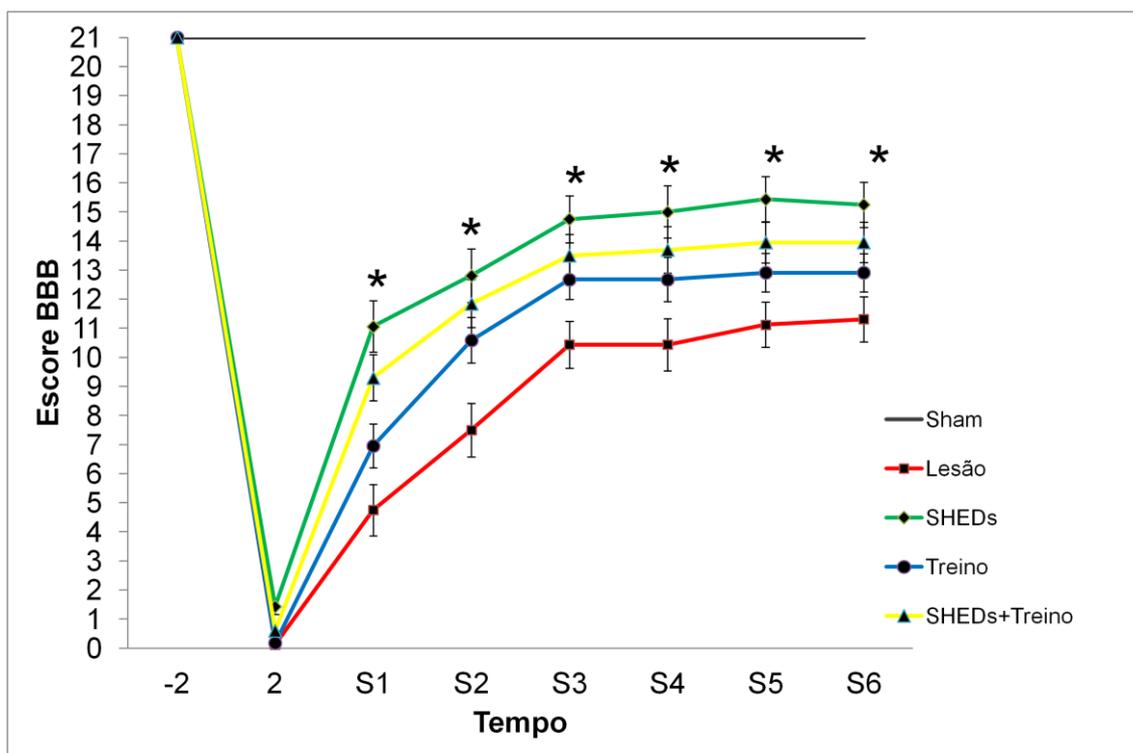


Figura 12. Avaliação locomotora pela Escala BBB. * Diferença dos grupos SHEDs e SHEDs+Treino contra o grupo Lesão. O grupo Sham é diferente dos demais grupos. O grupo treino não é diferente dos grupos tratados e o grupo Lesão. ANOVA de medidas repetidas ($F(4,46)=65,31$; $p<0,001$), seguida do teste de Bonferroni ($p<0,05$).

4.3 Histologia – Área de cavitação

Neste estudo, a análise histológica foi realizada para verificar a área de cavitação total da medula torácica após a lesão medular provocada pelo *NYU Impactor* e as diferenças quanto a abordagem de tratamento utilizado. Entre os cinco grupos experimentais, apenas os animais que sofreram lesão medular foram analisados, com seis animais em cada grupo.

A área de cavitação teve seu resultado expresso em $\mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$. O grupo lesão apresentou $3,79 \mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ de área de cavitação, não sendo diferente do grupo tratado com SHEDs, que apresentou $3,72 \mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ de área de cavitação. O grupo tratado com esteira não foi diferente dos grupos lesão, SHEDs e do SHEDs+Treino. Os animais com menor área de cavitação foram os tratados com a combinação de

SHEDs e treino locomotor, com $2,53 \mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ de área; este resultado foi significativamente diferente dos grupos lesão e SHEDs (Figura 14).

Figuras representativas da área de cavitação podem ser visualizadas como exemplo dos resultados obtidos de acordo com o tratamento utilizado na Figura 13.

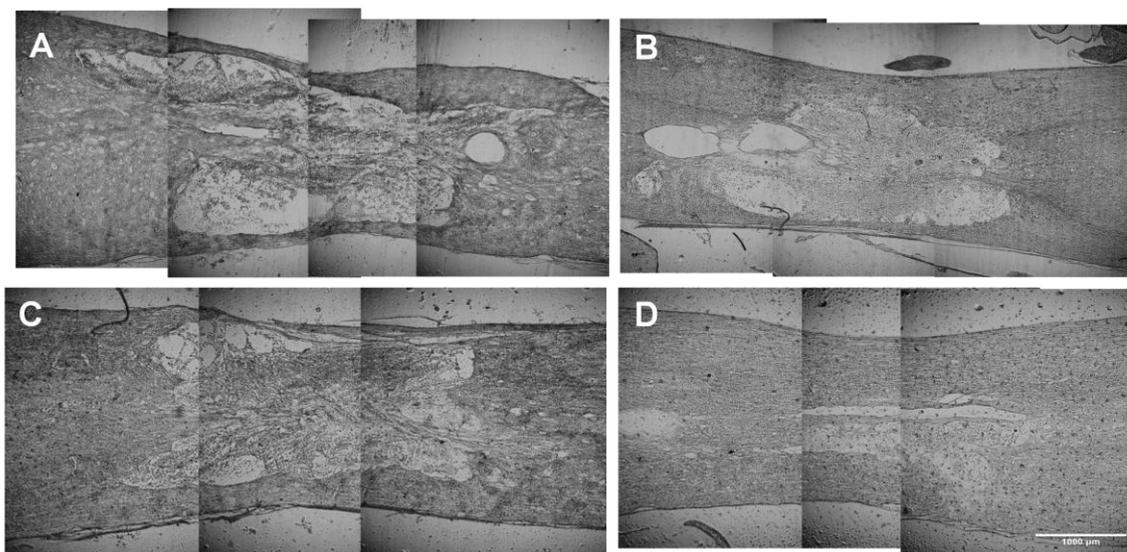


Figura 13. Imagens representativas das áreas de cavidade cística das medulas espinhas dos diferentes grupos. Grupo lesão (A), SHEDs (B), Treino locomotor (C) e SHEDs +Treino (D). Escala = 1000 μm .

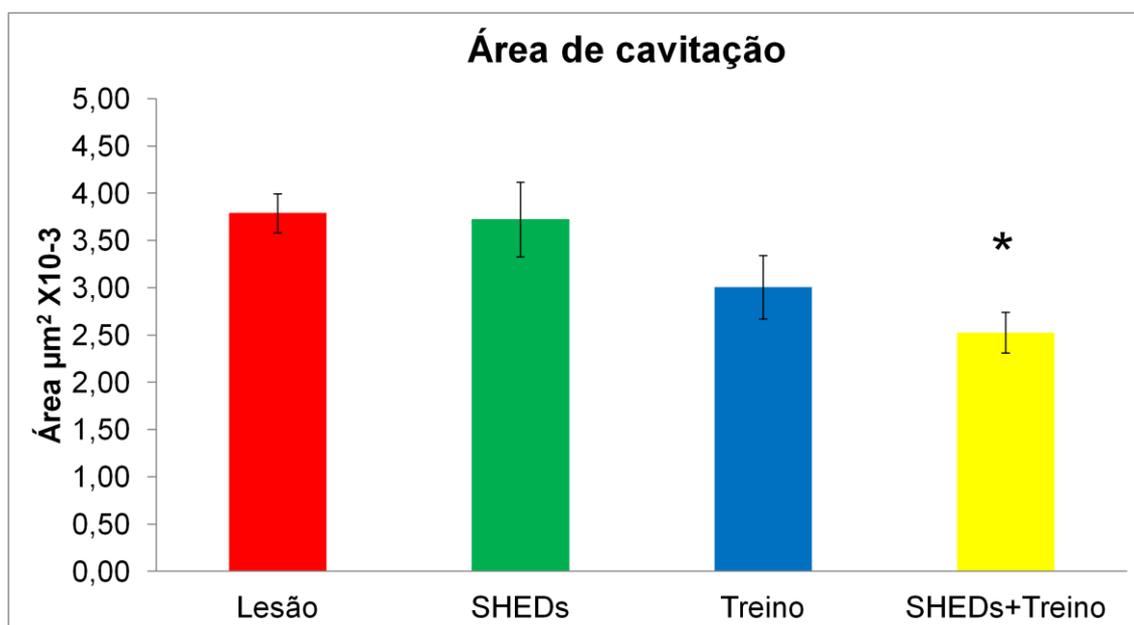


Figura 14. Quantificação da área cística (n = 6 animais/grupo). * Diferença quando comparado com os grupos Lesão e SHEDs. Os dados representam a médias \pm EP. ANOVA ($F(3,23)=4.11$; $p<0.05$) seguida de *post hoc* de Bonferroni.

4.4 Análise da imunofluorescência

Para a identificação das células transplantadas no tecido da medula espinhal dos animais, no local de lesão, foi utilizado o anticorpo anti-núcleo humano (HuNu), que permitiu visualizar as células que ainda estavam presentes no tecido após 6 semanas do transplante. A Figura 15 apresenta imagem representativa de células sobreviventes no local de lesão nos animais que receberam o transplante de SHEDs.

As SHEDs, após serem transplantadas para a medula espinhal dos animais que sofreram lesão medular, sobrevivem e permanecem no local de lesão após as 6 semanas de experimento.

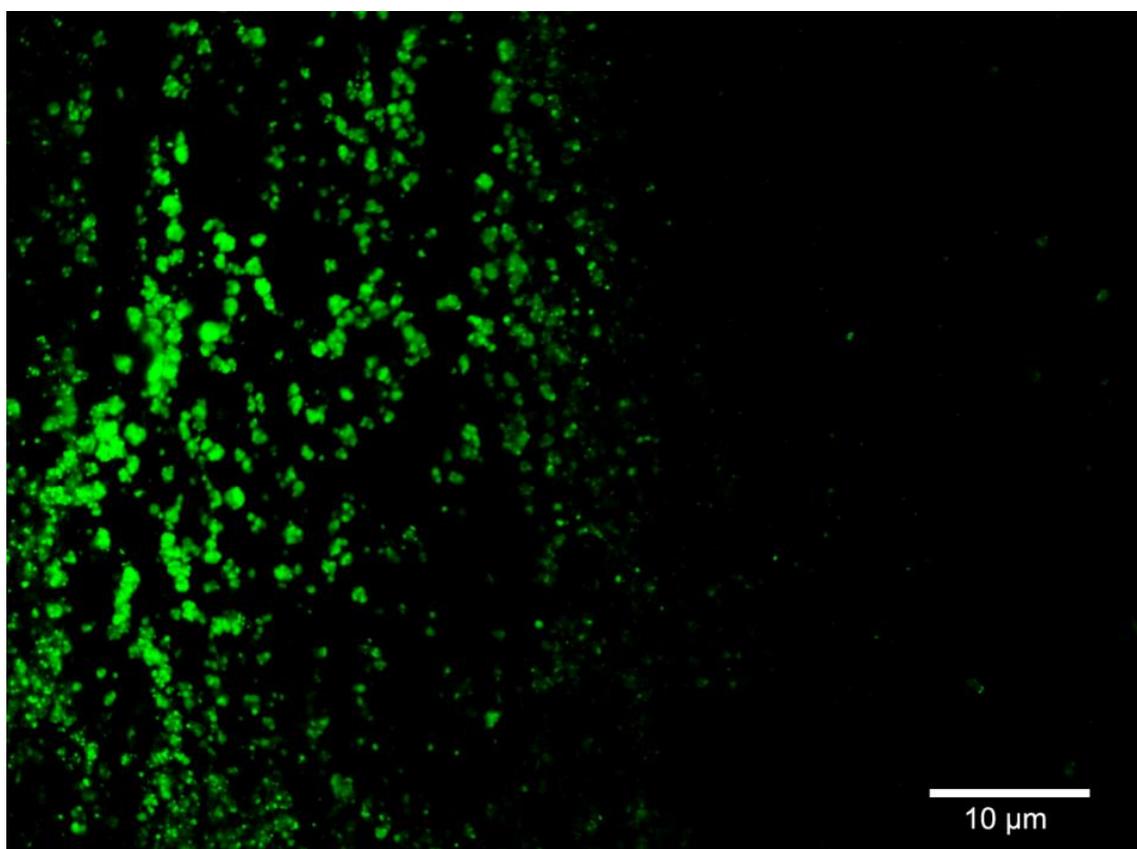


Figura 15. Identificação das células transplantadas expressando o antígeno para anti-núcleo humano (HuNu). Escala = 10 µm.

A Figura 16 demonstra a análise por imunofluorescência com dupla marcação realizada nos cortes longitudinais de ratos que sofreram a lesão medular e o transplante de células ou a combinação de transplante mais o treino em esteira, para HuNu (representado em verde) para a identificação das células humanas e GFAP (representado em vermelho) para a identificação dos astrócitos. Não foi observado co-localização destas células marcadas com HuNu e GFAP, indicando que não

houve diferenciação das SHEDs em astrócitos em ambos os grupos SHEDs (Figura 16 a,b,c) e SHEDs+Treino (Figura 16 d,e,f).

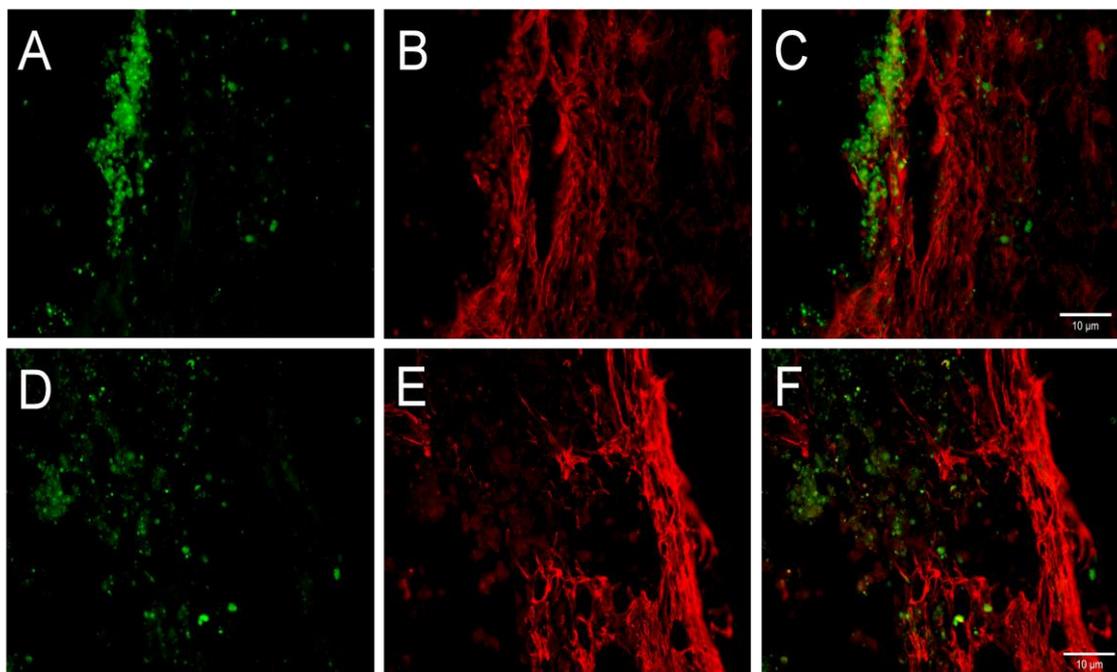


Figura 16. Dupla marcação mostrando as células transplantadas marcadas com HuNu (representado em verde) e GFAP (representado em vermelho) para a identificação dos astrócitos. As figuras mostram as SHEDs (A,D) no local de lesão, GFAP (B,E) e a sobreposição das imagens (C,F). Grupo SHEDs (A,B,C) e SHEDs+Treino (D,E,F). Escala = 10 μ m.

A Figura 17 apresenta as secções longitudinais de medula espinhal de animais tratados com o transplante de SHEDs ou a combinação dos tratamentos treino mais o transplante de SHEDs, marcadas duplamente com HuNu (Figura 17 a,d), neurofilamento (NF-M) (Figura 17 b,e) e a sobreposição das imagens (Figura 17 c,f). Não há co-localização entre HuNu e NF-M, evidenciando que, após 6 semanas do transplante, não houve diferenciação das SHEDs em neurônios, em ambos os grupos, SHEDs (Figura 17 a,b,c) e SHEDs+Treino (Figura 17 d,e,f).

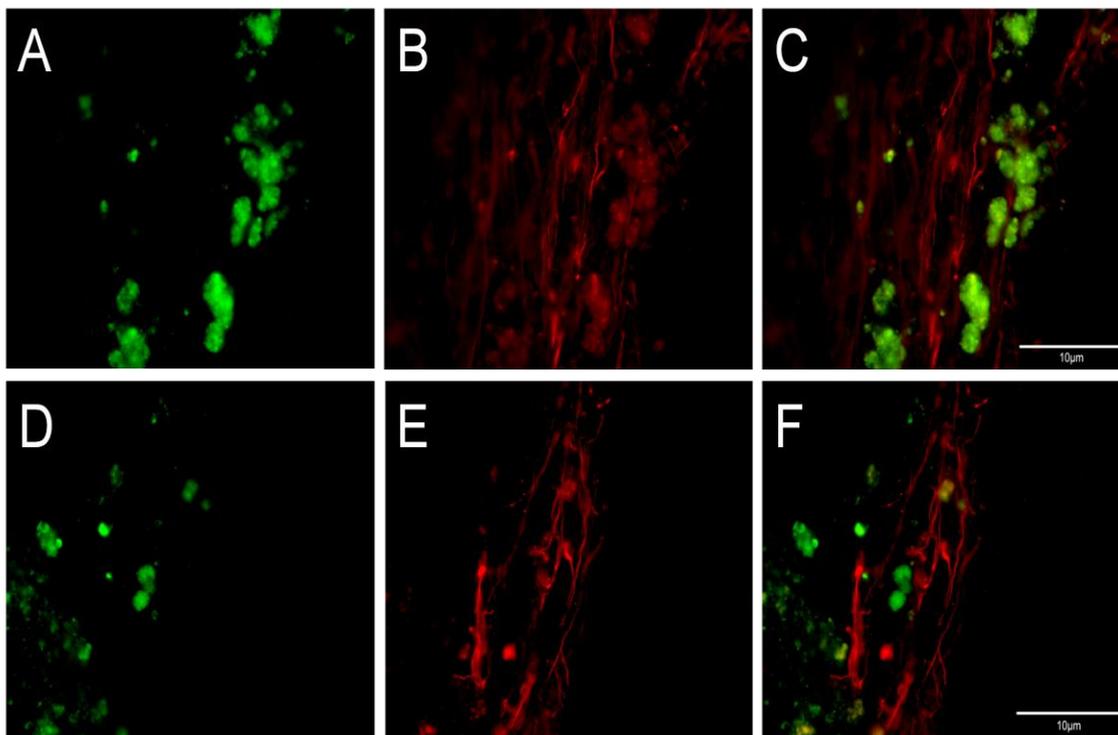


Figura 17. Dupla marcação mostrando as células transplantadas marcadas com HuNu (representado em verde) e NF-M (representado em vermelho) para a identificação dos neurônios. As figuras mostram as SHEDs (A,D) no local de lesão, NF-M (B,E) e a sobreposição das imagens (C,F). Grupo SHEDs (A,B,C) e SHEDs+Treino (D,E,F). Escala = 10 μ m.

4.4.1 Expressão de GFAP

Neste estudo, a marcação da proteína GFAP teve como objetivo, identificar as diferenças da expressão da proteína nos diferentes grupos, bem como apontar a astrogliose em diferentes condições após a lesão medular. Com o uso de imunofluorescência para a marcação de GFAP foi possível comparar a expressão desta proteína.

Na Figura 18 está representando cortes longitudinais de medula espinhal dos diferentes grupos, é possível visualizar a nítida diferença entre o grupo SHEDs (Figura 18 b) e os outros grupos, Lesão (Figura 18 a), Treino (Figura 18 c) e SHEDs+Treino (Figura 18 d) com relação à cicatriz glial. O grupo que apenas recebeu o transplante de células, visualmente apresenta menor expressão de GFAP próximo à lesão quando comparado com os demais grupos submetidos à lesão medular.

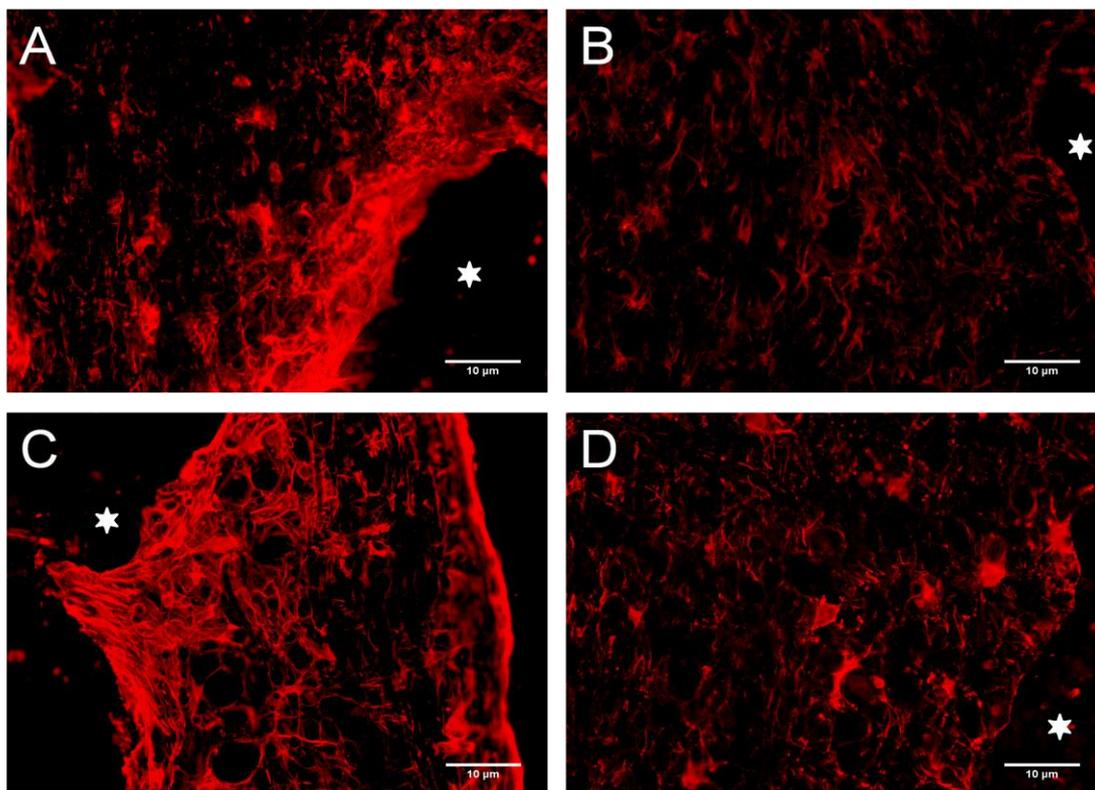


Figura 18. Região ao redor da lesão de cortes longitudinais de medula espinhal marcadas com GFAP. * Representam o local da lesão. Grupo Lesão (A), SHEDs (B), Treino (C) e SHEDs+Treino (D). Escala = 10 µm.

A partir das imagens geradas utilizando o microscópio confocal, foi possível realizar a quantificação da intensidade de GFAP nas medulas. A Figura 19 mostra a expressão da proteína GFAP nos diferentes grupos, dados representados pela intensidade de GFAP+ no tecido / área de interesse (mm^2). A intensidade da marcação de GFAP para o grupo Lesão é de $18,60 / \text{mm}^2$, Treino $18,70 / \text{mm}^2$, SHEDs+Treino $19,30 / \text{mm}^2$ não havendo diferenças entre estes grupos. Após a análise estatística, a ANOVA indicou o efeito significativo para o grupo SHEDs que obteve a menor média de intensidade, com o valor de $9,75 / \text{mm}^2$, quando comparado com os demais grupos ($F(3,57)=11,63$, $p<0,001$).

A partir destes resultados é possível identificar que a GFAP está menos presente nos animais que sofrem lesão medular e são tratados com SHEDs, reduzindo assim a ativação astrocitária no local da lesão. Já nos demais grupos que receberam tratamento (Treino e SHEDs+Treino), este efeito não foi visualizado.

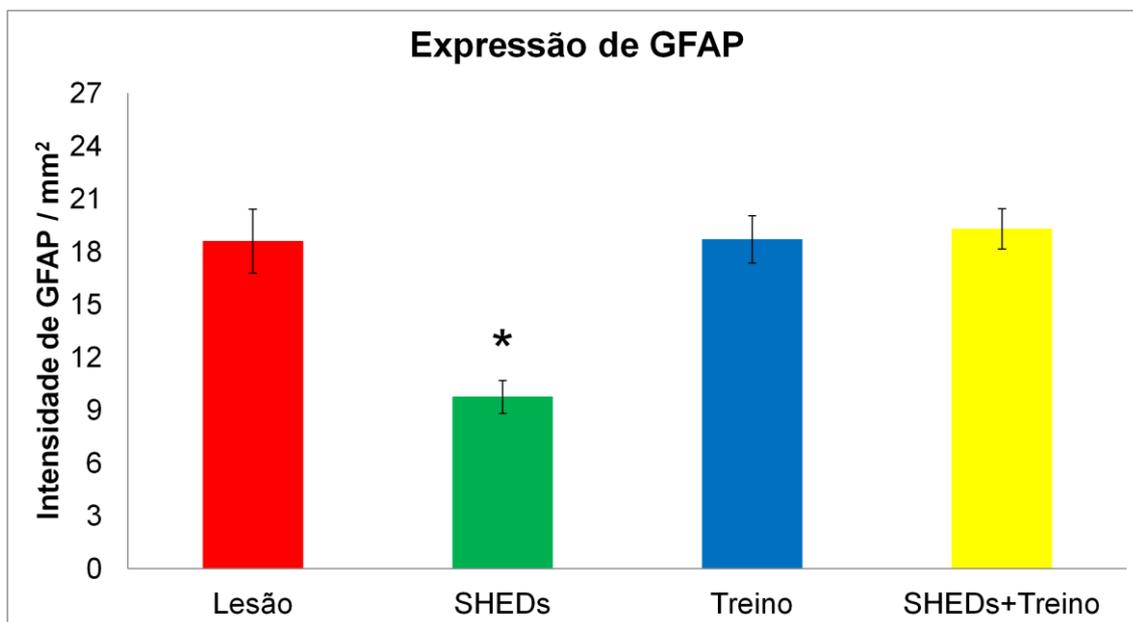


Figura 19. Quantificação expressão de GFAP ao redor da lesão, obtida de quatro regiões de interesse, rostral e caudal nos diferentes grupos. * Representa diferença significativa do grupo SHEDs quando comparado com os demais grupos. Os dados estão representados pela média \pm EP. ANOVA ($F(3,17)=13,74$, $p<0,001$) seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni.

4.4.2 Expressão de NF-M

As imagens por imunofluorescência das medulas espinhais dos diferentes grupos submetidos à lesão medular foram marcadas com NF-M para a visualização da integridade da via axonal próximo à lesão; a Figura 20 representa os diferentes grupos que sofreram lesão medular. Visualmente o grupo que apenas recebeu SHEDs, obteve maior preservação das vias axonais próximo à lesão.

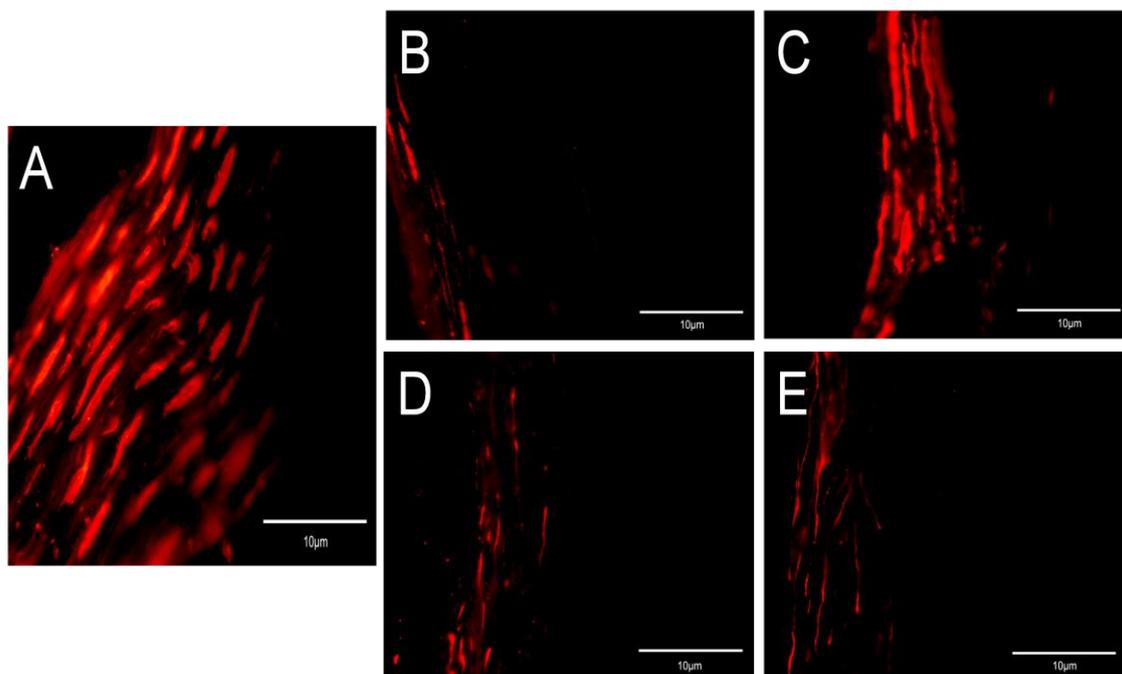


Figura 20. Imagens representativas de cortes longitudinais de medula espinal no nível de T10 marcadas com NF-M. Grupo Sham (A), Lesão (B), SHEDs (C), Treino (D) e SHEDs+Treino (E). Escala = 10 μm .

Com o objetivo de verificar a expressão de NF-M no epicentro da lesão, realizou-se a análise de intensidade de fluorescência / mm^2 de NF-M na medula espinal dos diferentes grupos. Os dados estão representados como intensidade de fluorescência / mm^2 de NF-M.

Na Figura 21 podemos visualizar que o grupo que recebeu apenas a lesão medular possui menor expressão de NF-M no epicentro da lesão (6,39 / mm^2), não sendo diferente dos grupos Treino (8,87 / mm^2) e o grupo SHEDs+Treino (12,67 / mm^2). O grupo que apenas recebeu o transplante de SHEDs obteve o maior índice, entre os animais dos grupos Lesão, Treino ou SHEDs+Treino, de NF-M no epicentro da lesão, o grupo que recebeu apenas o transplante de SHEDs se destacou (22,17 / mm^2), sendo diferente dos demais grupos. O grupo Sham obteve índice de 28,86 / mm^2 , sendo igual ao grupo que recebeu apenas o transplante de células e diferente dos demais grupos.

Com esses resultados pode-se observar que após a lesão medular moderada por contusão causada pelo *NYU impactor*, a expressão de NF-M diminuiu drasticamente, mantendo em média 22% da expressão após as seis semanas quando comparado com o grupo Sham. O grupo que recebeu apenas o tratamento com o transplante de SHEDs manteve ou recuperou 78% da expressão de NF-M no

epicentro da lesão, sendo capaz de reverter o prejuízo causado pelo dano. Os outros grupos, que receberam o treino em esteira, apesar de não serem diferentes do grupo sem tratamento, atingiram índices superiores ao grupo lesão.

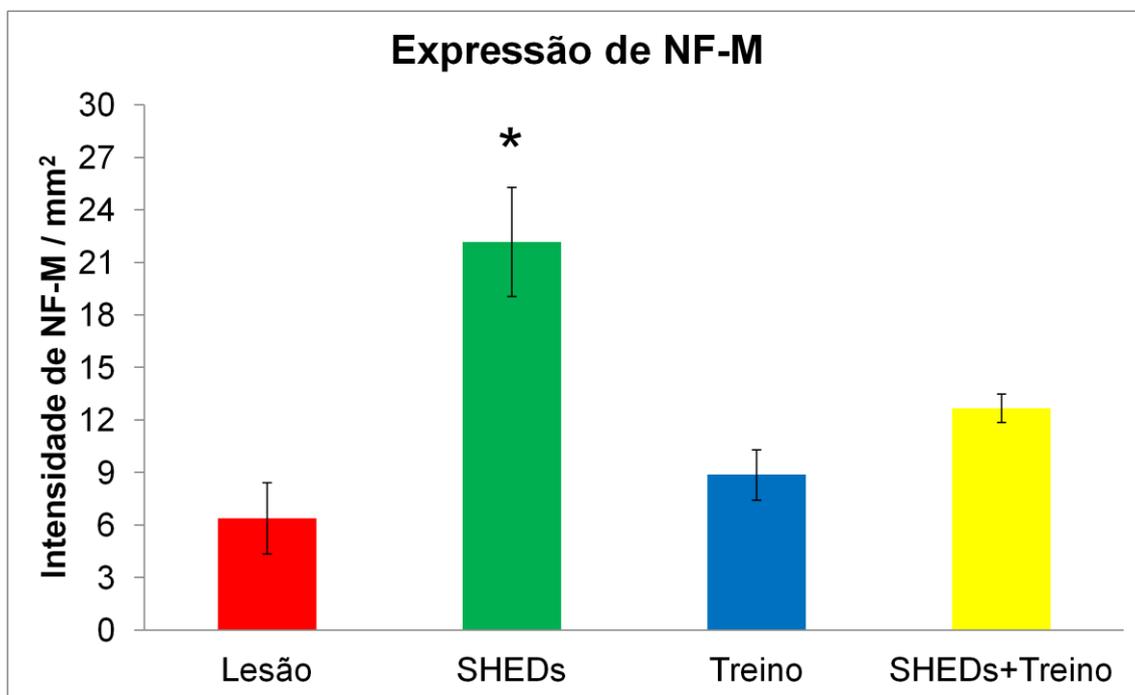


Figura 21. Expressão de NF-M no epicentro da lesão. * Representa diferença significativa quando comparado com os demais grupos. Os dados estão representados pela média da intensidade / mm² ± EP. ANOVA (F(3,17)=11,64, p<0,001) seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

A dificuldade em se estabelecer um tratamento adequado para os quadros de lesão medular se deve à sua complexa fisiopatologia, que consiste de mecanismos primários e secundários (OYINBO, 2011). Diversos estudos utilizando diferentes modelos experimentais de lesão medular têm sido desenvolvidos na tentativa de minimizar os déficits causados pela lesão medular, como o treinamento locomotor em esteira (BATTISTUZZO et al., 2012). Recentemente, o transplante celular vem sendo considerado uma estratégia importante e alguns estudos pré-clínicos (TETZLAFF et al., 2011) já foram realizados.

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar os efeitos do treinamento em esteira, o uso de células tronco mesenquimais derivadas do dente e a combinação das duas abordagens, na tentativa de potencializar os efeitos sobre a recuperação da função motora de animais submetidos à lesão medular induzida pelo equipamento *NYU impactor*. Os resultados encontrados demonstram que o transplante de células-tronco mesenquimais derivadas do dente, uma hora após lesão, assim como a combinação de células e o treino locomotor em esteira foram capazes de promover a recuperação da função motora. Os animais que receberam apenas o treino locomotor em esteira, iniciando três dias após lesão, não foi eficaz para a recuperação motora.

5.1 Recuperação da função motora

No modelo de lesão medular moderada por contusão produzida pelo equipamento *NYU impactor*, todos os animais devem estar com a pontuação próxima à zero, ou seja, com pouca ou nenhuma movimentação dos membros posteriores no segundo dia após a lesão. Com o passar dos dias e semanas, os animais apresentam recuperação espontânea, atingindo uma pontuação próxima a 12 pontos na última semana, incluindo os animais sem tratamento. O modelo de contusão produzido por esse sistema é considerado o melhor, por ser capaz de simular o quadro ocorrido em humanos (THURET; MOON; GAGE, 2006).

A melhora motora após lesão medular experimental com o uso de células-tronco de polpa de dente humano já havia sido demonstrada previamente. Taghipour e colaboradores (2012) utilizando SHEDs indiferenciadas e SHEDs induzidas na lesão medular, observaram melhora na recuperação da função motora de ratos após o transplante. Ainda, Sakai e colaboradores (2012) após transplante de células

humanas de dentes decíduos em medula lesada de ratos, observaram a melhora na recuperação da função. Em ambos os estudos a escala de Basso Beattie e Bresnahan (BBB) foi utilizada como método de avaliação da recuperação da função motora.

Neste estudo, ao final da primeira semana, os animais tratados com as células (11,06 pontos) apresentam pontuação similar quando comparados aos animais não tratados, na sexta semana (11,31 pontos) no BBB. Estes dados confirmam que as SHEDs foram capazes de potencializar os efeitos sobre a recuperação da função motora a partir da primeira semana após o tratamento, o que sugere que as SHEDs atuaram através de um mecanismo de neuroproteção e não de regeneração. Ao longo das semanas, os animais tratados com SHEDs permaneceram com médias significativamente maiores no BBB quando comparados ao grupo sem tratamento. Essa diferença, na última semana atinge valores de até 3,9 pontos a mais na escala do BBB para os animais que receberam o transplante, dados que corroboram, porém com diferenças mais expressivas são vistas no estudo de Taghipour e colaboradores (2012), utilizando o mesmo tipo de células-tronco.

Os animais do grupo treino locomotor não obtiveram os melhores resultados quanto à recuperação motora quando comparados ao grupo lesão. Já que não houve diferença significativa entre os animais do grupo lesão e o treino locomotor. Diversos estudos apresentam o treino locomotor como uma possível abordagem para as lesões medulares, mas ainda com resultados bastante controversos (BATTISTUZZO et al., 2012).

Park e colaboradores (2010) utilizaram um protocolo de treinamento em esteira similar ao usado no presente estudo. O início do treinamento em esteira foi realizado a partir do terceiro dia após a lesão, em duas sessões por dia, com velocidade média de 0,16 m/s durante 15 minutos, por quatro semanas. O trabalho obteve diferenças significativas entre os grupos treino e lesão na segunda semana após lesão, porém a diferença não se manteve ao fim da sexta semana. Utilizando o mesmo protocolo, Fouad e colaboradores (2000) não observaram diferenças comparando os grupos lesão e treino, onde concluem que o treino em esteira, realizado duas vezes por dia por 15 minutos em ratos com lesão medular incompleta não é capaz de promover melhora significativa na recuperação da função motora.

A ideia de relacionar o uso de dois treinos por dia a uma ineficácia da recuperação da função motora parece ser controversa. Um estudo realizado por Andrade, Mendonça e Chadi (2010), utilizando o modelo de lesão medular por contusão através do *NYU Impactor*, fez uso do protocolo de exercício em esteira de duas vezes ao dia, com velocidade de 0,17m/s durante 20 minutos cada sessão, 5 dias por semana por 4 semanas; e demonstrou rápida evolução dos animais treinados quando avaliados através da escala do BBB.

Na presente dissertação utilizamos um treino diário de 20 minutos, cinco dias por semana, com velocidade de 0,3 m/s. Os resultados reproduzidos por este protocolo utilizado, não contribuiu de maneira significativa para a recuperação da função motora. A conclusão sobre os efeitos do protocolo deve ser feita de maneira cuidadosa, uma vez que existem estudos utilizando protocolos similares, porém, reproduzindo resultados divergentes. Battistuzzo e colaboradores (2012) em um estudo de revisão mostraram que dentre os variados métodos de exercício, o treino em esteira e o nado forçado são os mais comuns entre os estudos que utilizam o modelo de lesão medular por contusão. Battistuzzo e colaboradores (2012) concluem que o treino locomotor com o início entre o 7º e do 16º dia após lesão medular (fase subaguda de lesão) possa ser mais efetivo para a recuperação da função motora.

Nosso estudo é pioneiro ao combinar o tratamento com células-tronco e o treinamento em esteira. Não há relatos até o presente momento demonstrando o uso de células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente combinado ao treinamento em esteira como uma possível abordagem do tratamento da lesão medular experimental. Os resultados aqui apresentados demonstram que a combinação de SHEDs com o treino locomotor em esteira é eficaz no tratamento da lesão medular experimental, mas não é melhor do que apenas o uso de SHEDs. Esse fato nos faz refletir sobre o uso do treino em esteira combinado ao transplante de células. Se apenas o transplante de células é melhor que a combinação de ambas, certamente o emprego do treino locomotor associado ao tratamento com SHEDs foi prejudicial à resposta do transplante das células e o resultado positivamente significativo se deva ao transplante de SHEDs. Uma possível explicação para isto, é que o início do treino em esteira teve começo muito próximo à lesão medular e o transplante de células, sugerindo um possível efeito do estresse causado pelo exercício, reduzindo a recuperação nos primeiros dias pós-lesão, o

que compromete o desenvolvimento pleno da função locomotora nos dias que se seguem. Como já discutido anteriormente, o protocolo utilizado necessita ser revisto. Mudanças de parâmetros no protocolo do treino em esteira, como o tempo de exposição dos animais à esteira e tempo de início do treino após a lesão podem mudar substancialmente o quadro de resultados favorecendo a recuperação quando combinado ao transplante de células.

5.2 Influência dos tratamentos no tecido

5.2.1 Área de cavitação

A astrogliose reativa ocorre após lesões do sistema nervoso central, e resulta em formação de cicatriz glial e de áreas de cavitação (DAVIES et al., 1997; DAVIES et al., 1999), estando relacionada aos mecanismos secundários da lesão medular. A área de cavitação é uma das medidas utilizadas para avaliar o tamanho da lesão na medula espinhal. Assim como neste estudo, Parr e colaboradores (2008) consideraram todo e qualquer tecido necrótico dentro da cavidade como parte da lesão, sendo assim contabilizado. A área de cavitação não foi diferente entre o grupo que recebeu o transplante de células-tronco e o grupo lesão, o que demonstra que, aparentemente a injeção das células não favoreceu a recuperação morfológica da medula espinhal. Já se demonstrou que diferentes tipos celulares, quando implantados após lesões na medula espinhal podem produzir diferentes resultados. O estudo de Parr e colaboradores (2008), que utilizou o transplante de células-tronco progenitoras neurais (NSPCs) e células-tronco mesenquimais de medula óssea (BMSC), demonstrou que os animais que receberam o transplante de BMSC tiveram redução da área de cavitação da medula espinhal lesada, enquanto que os animais que receberam o transplante de NSPCs permaneceram com suas áreas de cavitação inalteradas. No entanto, o mesmo estudo observou que o tamanho da cavidade cística aparentemente não tem relação com a recuperação da função motora, pois os animais tratados com o transplante de NSPCs que apresentaram maiores áreas de cavitação atingiram pontuações mais elevadas no BBB (chegando a 19 pontos); enquanto que os animais submetidos ao transplante de BMSC que apresentaram pequenas áreas de cavitação, atingiram no máximo 13 pontos no BBB. Portanto, são necessários estudos para o esclarecimento das respostas

diferenciadas dos diferentes tipos celulares transplantadas em relação à recuperação da função motora e da extensão da cavidade cística.

O grupo submetido ao treino locomotor quando comparado ao grupo lesão, demonstrou uma tendência em apresentar menores áreas de cavitação, porém não estatisticamente significativa. O estudo de Andrade; Mendonça; Chadi (2010) mostra que quanto à área de lesão, os animais treinados em esteira quando comparados aos animais sedentários são diferentes; uma menor área de cavitação foi observada nos animais treinados, o que os levou a concluir que o treino em esteira induz uma proteção tecidual que foi associada à melhora da resposta locomotora após lesão medular. O grupo que recebeu o transplante de SHEDs associado ao treino locomotor apresentou melhora significativa quando comparado ao grupo lesão; as áreas de cavitação encontradas nos animais que receberam o tratamento associado foram menores, favorecendo a proteção tecidual da medula espinhal dos animais lesados quanto à formação da área de cavitação, o que pode justificar assim seu desempenho funcional superior ao grupo lesão.

5.2.2 Expressão de GFAP por astrócitos

A resposta astrocitária à lesão é uma das características empregadas para identificar a extensão e a severidade da lesão, sendo os termos “astrogliose” e “cicatriz glial” frequentemente usados para descrever a reação dos astrócitos após a lesão medular (MENEZES et al., 2010; CENTENARO et al., 2011). A hipertrofia astrocitária, a hiperplasia, e o aumento na produção de filamentos intermediários caracterizam a gliose astrocitária, referidos como “astrócitos reativos” quando estas células respondem por estes mecanismos à lesão (BIGNAMI et al., 1972). Os astrócitos são facilmente identificados por métodos de imunofluorescência utilizando o anticorpo específico para a GFAP (MESTRINER et al., 2011). Assim, a hipertrofia astrocitária ou a super-expressão de GFAP são características conhecidas de astrócitos reativos e são marcadores de cicatriz glial.

A análise de intensidade de fluorescência mostra que os animais do grupo lesão apresentam uma grande área de cicatriz glial. Neste estudo, quando a intervenção de tratamento foi apenas o uso de SHEDs, os animais apresentaram menor astrogliose ao redor da lesão. Salazar e colaboradores (2010) utilizando o transplante de células-tronco neurais humanas em camundongos submetidos à lesão medular contusa e verificaram que a área de cicatriz glial não foi diferente do

grupo sem tratamento, ou seja, o grupo que recebeu apenas lesão medular apresentou grandes áreas preenchidas por GFAP+, sendo que o transplante de CTN não foi capaz de reduzir a área de GFAP+.

Até o momento, não há relatos da utilização da técnica de imunofluorescência para a marcação de GFAP para a posterior análise da quantificação de astrogliose após o transplante de SHEDs. Estudos utilizando diferentes tipos de CTs fazem uso dessa análise. Jeong e colaboradores (2012) utilizando o transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea humana (BMSC) na medula espinhal de ratos lesados observaram grandes áreas GFAP+, comparáveis ao grupo que não recebeu tratamento. Porém, quando estas células-tronco mesenquimais de medula óssea foram programadas para produzir o fator de crescimento de hepatócitos e transplantadas na medula dos animais com lesão medular, houve uma redução significativa na área GFAP+ ao redor da lesão, indicando que a produção deste fator de crescimento possui grande interferência na formação da cicatriz glial (JEONG et al., 2012).

Como as CTs podem ser provenientes de diferentes fontes, elas podem secretar diferentes produtos, interagir de diferentes maneiras com o tecido e produzir diferentes respostas. No estudo de Sakai e colaboradores (2012) foram comparados dois tipos de CTs, as células-tronco mesenquimais de dente decíduo humano (SHEDs) e as células-tronco mesenquimais de medula óssea humana (hBMSC), para verificar a expressão de genes relacionados à matriz extracelular, mitose, superfície celular e vias de sinalização, dentre outros. A conclusão que o grupo de Sakai e colaboradores (2012) chegaram é de que as células-tronco humanas de dente decíduo expressam muitos genes na categoria de matriz extracelular e de superfície celular, de proliferação celular e de desenvolvimento de tecido embrionário, em níveis pelo menos 2 vezes maiores que as células-tronco mesenquimais de medula óssea.

As consequências de uma expressão genética elevada para algumas proteínas relacionadas à matriz extracelular, superfície celular e proliferação celular, por parte das SHEDs, causam respostas diferentes quando comparadas a outros tipos celulares, quando estas células são utilizadas em experimentos *in vitro* ou *in vivo*. Quando as SHEDs são colocadas em meio controlado (*in vitro*) com neurônios e moléculas inibidoras do crescimento axonal, são capazes de regenerar axônios seccionados através da inibição direta dos agentes inibidores do crescimento

axonal, como o sulfato de condroitina (CSPG) e a glicoproteína associada à mielina (MAG) (SAKAI et al.,2012). Sabe-se que a cicatriz glial é constituída por astrócitos reativos e proteoglicanos como o CSPG, e que os axônios não podem regenerar além da cicatriz glial, tornando-se distróficos (SILVER; MILLER, 2004). SAKAI e colaboradores (2012) após o uso das SHEDs em culturas contendo inibidores do crescimento neural visualizaram que as SHEDs foram capazes de inibir os inibidores do crescimento; da mesma forma que acontece em culturas, as SHEDs podem estar inibindo os inibidores do crescimento neural *in vivo*, e já que na presente dissertação foi visualizada a inibição da astrogliose, pode ser que esteja inibindo também a liberação de CSPG pelos astrócitos e outros inibidores do crescimento neural.

5.2.3 Expressão de neurofilamento pelos neurônios.

Após a análise por imunofluorescência com a marcação de neurofilamento médio (NF-M) podemos identificar as vias axonais presentes na medula espinhal de animais que foram submetidos à lesão medular ou não. A partir das imagens capturadas pelo microscópio confocal, foi realizada a análise de intensidade de NF-M nos grupos submetidos à lesão medular. O grupo que recebeu o transplante de SHEDs apresentou alta intensidade desta proteína presente no epicentro da lesão, enquanto que os demais grupos tratados não diferiram do grupo lesão. Park e colaboradores (2011) realizaram o transplante de células-tronco mesenquimais na medula espinhal de ratos submetidos à lesão medular por compressão, e observaram um aumento na densidade de NF-M na medula dos animais que receberam o transplante de células. O aumento da expressão dessa proteína, ou sua manutenção parcial, é indicativo que os axônios destes neurônios se encontram em melhores condições, e que possivelmente, esteja relacionado com o melhor desempenho destes animais com relação à recuperação da função motora. É provável que a ativação, ou a inativação, dos astrócitos desempenhe um papel crucial para a manutenção da expressão da proteína NF-M, já que neste estudo os animais lesados que receberam as SHEDs apresentaram menor expressão de GFAP associado à maior expressão de NF-M.

Os animais treinados em esteira não foram diferentes dos animais que foram submetidos apenas à lesão medular, portanto não houve facilitação da manutenção da integridade das vias axonais promovida pelo exercício. Hutchinson e colaboradores (2004) utilizando um modelo de lesão medular por contusão, e

submetendo os animais ao treino em esteira, avaliaram a permanência de substância branca na medula espinhal dos animais submetidos à lesão medular. O grupo treinado não foi capaz de reverter a perda de substância branca no epicentro da medula espinhal quando comparados com os animais apenas lesionados. Estes dados são compatíveis com nossos resultados, uma vez que também avaliamos as vias axonais de neurônios no epicentro da lesão. Garcia e colaboradores (2012), avaliando a expressão de diferentes proteínas em animais saudáveis submetidos ao treino em esteira, observaram que o NF-M está diminuído no córtex motor de animais saudáveis.

Apesar dos resultados negativos apresentados pelo treino em esteira relacionados à proteína NF-M na medula espinhal de ratos lesados medulares, são necessários mais estudos para o esclarecimento do protocolo ideal de exercício, uma vez que a maioria dos estudos publicados utilizando esta abordagem relatam resultados positivos quanto à recuperação da função motora (BATTISTUZZO et al., 2012).

5.2.4 Mecanismos de ação

Macias e colaboradores (2009) observaram que utilizando o treino em esteira para a recuperação de ratos com lesão completa de medula, houve um aumento nas sinapses e aumento de BDNF, referindo que o exercício em esteira muda a distribuição de BDNF nas fibras se concentrando no núcleo dos neurônios motores, bem como nos prolongamentos mais longos e espessos. De acordo com Sandrow-Feinberg e colaboradores (2009), neurotrofinas como o BDNF são proteínas importantes para a sobrevivência, diferenciação e crescimento de neurônios e, o exercício forçado por cinco dias, seria capaz de aumentar substancialmente a expressão de BDNF ao redor da lesão. Esse aumento na expressão pode afetar diretamente a neuroplasticidade e/ou regeneração dos axônios lesados, e pode ser uma das explicações para o uso do treino locomotor em esteira. Como os resultados deste trabalho utilizando apenas o treino locomotor não promoveu recuperação da função motora, redução da área de cavitação, diminuição da resposta astrocitária e também não interferiu na expressão de NF-M em neurônios, é preciso maior esclarecimento quanto à biologia molecular que envolve esse protocolo, bem como propor outras janelas de intervenção.

Após a análise por microscopia confocal, foi possível avaliar a sobrevivência das células transplantadas. As SHEDs sobreviveram após o transplante, permanecendo no tecido até a sexta semana pós-lesão, porém não foi identificada co-localização das SHEDs transplantadas com NF-M ou GFAP, ou seja, não houve diferenciação das SHEDs em neurônios ou astrócitos. Sakai e colaboradores (2012) observaram na sexta semana após o transplante de SHEDs diretamente na medula de animais submetidos à lesão medular experimental, que as células foram capazes de expressar proteína básica de mielina (MBP) e APC (indicativos da diferenciação em oligodendrócitos) e concluíram que estas SHEDs se diferenciaram em oligodendrócitos. Quando marcadas com GFAP para verificar a diferenciação em astrócitos na medula espinhal dos animais lesados, não visualizou a co-localização, assim como para o NF-M, para neurônios, indicando que as SHEDs não se diferenciaram em neurônios ou astrócitos. Na presente dissertação, não foram realizadas as marcações necessárias para confirmar a diferenciação em oligodendrócitos, sendo esta, uma possível análise a ser realizada no futuro.

O estudo de Park e colaboradores (2010) demonstrou que o transplante de células-tronco leva a uma melhora da função motora, sem que ocorra diferenciação em neurônios ou astrócitos, corroborando com os nossos resultados. As células-tronco mesenquimais parecem não estar necessariamente relacionadas à substituição de neurônios perdidos, mas agem como neuroprotetoras através da liberação de fatores tróficos como BDNF, NGF e VEGF, que estimulam a sobrevivência e o crescimento do nervo (WRIGHT et al., 2011; KIM; LEE; KIM, 2010). Além dos fatores de crescimento, as células podem promover a inibição de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), secretados pelos macrófagos ativados.

Os efeitos das células-tronco são multifatoriais e é razoavelmente difícil atribuí-los a apenas um mecanismo. Neste estudo, pudemos verificar que o tratamento da lesão medular experimental com o transplante de SHEDs promoveu uma redução significativa na cicatriz glial e aumento na expressão de NF-M em neurônios, sendo possivelmente favorecido pela liberação de fatores tróficos e inibição da inflamação, o que resultou em recuperação da função motora. Já no grupo apenas tratado com o treino locomotor, não houve diminuição da cavidade cística; tal efeito associado ao aumento na cicatriz glial pode ter favorecido ao pior desempenho na avaliação motora. O grupo que recebeu a combinação de treino e o

transplante de SHEDs, apesar de apresentar aumento na cicatriz glial, houve uma tendência de aumento na expressão de NF-M, e teve diminuição na cavidade cística, o que pode ter favorecido a recuperação da função motora.

6. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos na presente Dissertação podemos concluir que:

- O tratamento com o transplante de SHEDs ou a combinação de tratamentos de SHEDs e Treino locomotor promoveu a recuperação da função motora de ratos submetidos à lesão medular; enquanto que o tratamento apenas com o treino locomotor em esteira não foi eficaz para a recuperação da função motora;
- O transplante de células ou o apenas o treino em esteira não influencia na área de cavitação, permanecendo igual ao grupo lesão; já a combinação dos tratamentos, transplante de células e o treino locomotor reduz a área de cavitação;
- As SHEDs quando transplantadas no local da lesão 1h após lesão, sobrevivem, e permanecem na medula espinhal após as 6 semanas, não sendo observada diferenciação das SHEDs em neurônios ou astrócitos na medula espinhal dos animais lesados;
- A astrogliose é menor no grupo que recebe apenas o transplante de células-tronco; e, maior nos grupos lesão, treino locomotor e o grupo com a combinação dos tratamentos;
- A expressão de NF-M pelos axônios de neurônios da medula espinhal é maior no grupo que recebeu apenas o transplante de células-tronco, entre os demais grupos que receberam lesão medular;

Ambos os tratamentos com o transplante de SHEDs foram eficazes para a recuperação de ratos Wistar submetidos à lesão medular experimental.

7. PERSPECTIVAS

- Definir a janela de intervenção para o treino locomotor em esteira após a lesão medular experimental;
- Estudar os possíveis mecanismos inflamatórios e hormonais envolvidos na recuperação da função motora, nas fases aguda e subaguda da lesão experimental; em ambos os tratamentos;
- Estudar outros mecanismos biológicos, como as proteínas de matriz extracelular que estão envolvidas diretamente na inibição de crescimento neural, assim como as que estão envolvidas no desenvolvimento neural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M.S.R; MENDONÇA, L.M; CHADI, G. Treadmill running protects spinal cord contusion from secondary degeneration. **Brain Res.** v.1346, p.266–278, 2010.

AZARI, F.M; MATHIAS, L; OZTURK, E; CRAM, S.D; BOYD, R.L; PETRATOS, S. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of CNS Injury. **Current Neuropharmacology.** v.8, p.316-323, 2010.

BARBEAU, H. Locomotor training in neurorehabilitation: emerging rehabilitation concepts. **Neurorehabil Neural Repair.** v.17, p.3-11, 2003.

BARBEAU, H.; ROSSIGNOL, S. Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. **Brain Res.** v.412, p.84–95, 1987.

BARNABÉ-HEIDER, F.; FRISÉN, J. Stem Cells for Spinal Cord Repair. **Cell Stem Cell.** v.3, p.16-24, 2008.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J. Neurotrauma,** n. 12, p. 1–21, 1995.

BATTISTUZZO, C.; CALLISTER, R.; CALLISTER, R.; GALEA, M. A Systematic Review of Exercise Training To Promote Locomotor Recovery in Animal Models of Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma.** v.29, p.1600-1613, 2012.

BEHRMAN, A.L.; HARKEMA, S.J. Locomotor training after human spinal cord injury: a series of cases studies. **Phys. Ther.** v.80, p.688-700, 2000.

BERNARDI, L.; LUISI, B.S.; FERNANDES, R.; DALBERTO, T.P.; VALENTIM, L.; CHIES, J.B.A.; FOSSATI, A.C.M.; PRANKE, P. The Isolation of Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp Is Related to the Physiological Process of Resorption. **J Endod.** v.37, n.7, p. 973–979, 2011.

BIANCO, P.; ROBEY, P. Diseases of bone and the stromal. **J Bone Miner Res.** v.14, n. 3, p. 336-41, 1999.

BIGNAMI, A.; ENG. L.F.; DAHL, D.; UYEDA, C.T. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. **Brain Res.** v.43, p.429-435, 1972.

BONILLA, S.; SILVA, A.; VALDÉS, L.; GEIJO, E.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; MARTÍNEZ, S. Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. **Neuroscience.** v. 133, p. 85-95, 2005.

BORGENS, R.B.; LIU-SNYDER, P. Understanding secondary injury. **Q Rev Biol.** v.87, n. 2, p. 89-127, 2012.

BRACKEN, M. B.; SHEPARD, M. J.; COLLINS, W. F.; HOLFORD, T. R.; BASKIN, D. S.; EISENBERG, H. M.; FLAMM, E.; LEO-SUMMERS, L.; MAROON, J.; LARSHALL, L. F.; PEROT Jr., P. L.; PIEPMEIR, J.; SONTAG, V. K. H.; WAGNER, F. C.; WILBERGER, J. E.; WINN, H. R. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of Second National Acute Spinal Cord Injury Study. **N. Engl. J. Med.** v. 322, p. 1405-1411, 1990.

BUSCH, S.A.; SILVER, J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. **Curr Opin Neurobiol.** v.17, p.120–127, 2007.

CAO, Q.; XU, X.M.; DEVRIES, W.H.; ENZMANN, G.U.; PING, P.; TSOULFAS, P.; WOOD, P.M.; BUNGE, M.B.; WHITTEMORE, S.R. Functional recovery in traumatic spinal cord injury after transplantation of multilineurotrophin- expressing glial-restricted precursor cells. **J Neurosci.** v.25, p.6947-6957, 2005.

CAO, Q.L.; ZHANG, Y.P.; HOWARD, R.M.; WALTERS, W.M.; TSOULFAS, P.; WHITTEMORE, S.R. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. **Exp Neurol.** v.167, p.48–58, 2001.

CENTENARO, L.A.; JAEGER, C.M.; ILHA, I.J.; SOUZA, A.M.; KALIL-GASPAR, I.P.; CUNHA, B.N.; MARCUZZO, S.; ACHAVAL, M. Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord transection in rats: Effects on functional recovery and axonal regeneration. **Brain Research**. v.1426, p.54–72, 2011.

DASARI, V.R; SPOMAR, D.G; CADY, C; GUJRATI, M; RAO, J.S; DINH, D.H. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. **Neurochem. Res**. v.32, n.12, p.2080-2093, 2007b.

DASARI, V.R; SPOMAR, D.G; GONDI, C.S; SLOFFER, C.A; SAVING, K.L; GUJRATI, M; RAO, J.S; DINH, D.H. Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. **J. Neurotrauma**. v.24, n.2, p.391-410, 2007a.

DAVIS, A.A.; TEMPLE, S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. **Nature**. v. 17, n. 372, p. 263-6, 1994.

DAVIES, S.J.; GOUCHER, D.R.; DOLLER, C.; SILVER, J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. **J. Neurosci**. v.19, p. 5810–5822, 1999.

DAVIES, S.J.; FITCH, M.T.; MEMBERG, S.P.; HALL, A.K.; RAISMAN, G.; SILVER, J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. **Nature**. v.390, p. 680–683, 1997.

DE LEON, R.D.; HODGSON, J.A.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R. Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery following spinalization in cats. **J Neurophysiol**. v.79, p.1329–40, 1998.

DENG, W.; FISCHER, O.; PROCKOP, D. J. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. v. 282, p. 148-152, 2001.

DIETZ, V. Proprioception and locomotor disorders. **Nat. Rev. Neurosci.** v.3, p.781–790, 2002.

DIETZ, V. Spinal cord pattern generators for locomotion. **Clin Neurophysiol.** v.114, p.1379–1389, 2003.

DUYSENS, J.; VAN de CROMMERT, W.A.A. Neural control of locomotion; Part 1: The central pattern generator from cats to humans. **Gait Posture.** v.7, p.131-141, 1998.

ERCEG, S.; RONAGHI, M.; ORIA M.; ROSELLO, M.G.; ARAGO, M.A.P.; LOPEZ, M.G.; RADOJEVIC, I.; MORENO-MANZANO, V.; JIMENEZ, F.J.R.; BHATTACHARYA, S.S.; CORDOBA, J.; STOJKOVIC, M. Transplanted Oligodendrocytes and Motoneuron Progenitors Generated from Human Embryonic Stem Cells Promote Locomotor Recovery After Spinal Cord Transection. **Stem Cells.** v.28, p.1541–1549, 2010.

FAWCETT, J.W.; ASHER, R.A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Res Bull.** v.49, p.377–391, 1999.

FLEMING, J.C.; NORENBURG, M.D.; RAMSAY, D.A.; DEKABAN, G.A.; MARCILLO, A.E.; SAENZ, A.D.; PASQUALE-STYLE, M.; DIETRICH, W.D.; WEAVER, L.C. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. **Brain.** V.129, p.3249–3269, 2006.

FOK-SEANG, J.; SMITH-THOMAS, L.C.; MEINERS, S.; MUIR, E.; DU, J.S.; HOUSDEN, E.; JOHNSON, A.R.; FAISSNER, A.; GELLER, H.M.; KEYNES, R.J.; ROGERS, J.H.; FAWCETT, J.W. An analysis of astrocytic cell lines with different abilities to promote axon growth. **Brain Res.** v.689, p.207–223, 1995.

FOUAD, K.; METZ, G.A.; MERKLER, D.; DIETZ, V.; SCHWAB, M.E. Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. **Behav Brain Res.** v.115, p.107-113, 2000.

FREED, C. R.; GREENE, P. E.; BREEZE, R. E.; TSAI, W. Y.; DuMOUCHEL, W.; KAO, R.; DILLON, S.; WINFIELD, H.; CULVER, S.; TROJANOWSKI, J. Q. Transplantation from embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. **New Engl. J. Med.** v. 344, p. 710-719, 2001.

FRIENDENSTEIN, A.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; FROLOVA, O.F. Heterotypic transplants of bone marrow: analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation.** v.6, p.230-247, 1968.

GANDARILLAS, A.; WATT, F.M. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. **Genes Dev.** v.11, n.21, p.2869-82, 1997.

GARCIA, P.; REAL, C.; FERREIRA, A.; ALOUCHE, S.; BRITTO, L.; PIRESA, R. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. **Brain Research.** v.1456, p.36-48, 2012.

GONDIM, F. A. A.; OLIVEIRA, G. R.; ROLA, S. H. Complicações Clínicas de Injúrias Medulares. **Revista Brasileira de Neurologia.** v. 34, n. 2, p. 47-54, 1998.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L.W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J. Dent. Res.** v.81, 531–535, 2002.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.97, p.13625–13630, 2000.

GRILLNER, S. Interaction between central and peripheral mechanisms in the control of locomotion. **Prog. Brain Res.** v.50, p.227–235, 1979.

GRUNER, J. A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. **J. Neurotrauma,** n. 9, p. 123–126, 1992.

HARKEMA, S.J. Neural plasticity after human spinal cord injury: application of locomotor training to the rehabilitation of walking. **Neuroscientist**. v.7, p.455–468, 2001.

HARKEMA, S.J.; HURLEY, S.L.; PATEL, U.K.; REQUEJO, P.S.; DOBKIN, B.H.; EDGERTON, R. Human lumbosacral spinal cord interprets loading during stepping. **J Neurophysiol**. v.77, p.797–811, 1997.

HICKS, A.L.; ADMAS, M.M.; MARTIN, G.K.; GIANGREGORIO, L.; LATIMER, A.; PHILLIPS, S.M.; McCARTNEY, N. Long-term body-weight-supported treadmill training and subsequent follow-up in persons with chronic SCI: effects on functional walking ability and measures of subjective well-being. **Spinal Cord**. v. 43, p.291–298, 2005.

HO, C.H.; WUERMSER, L.A.; PRIEBE, M.M.; CHIODO, A.E.; SCELZA, W.M.; KIRSHBLUM, S.C. Spinal cord injury medicine. Epidemiology and classification. **Arch Phys Med Rehabil**. v.88, n.3, Suppl 1, p.49-54, 2007.

HORNER, P.J.; GAGE, F. H. Regenerating the damage central nervous system. **Nature**. v. 407, p. 963-970, 2000.

HUTCHINSON, K.J.; GÓMEZ-PINILLIA, F.; CROWE, M.J.; YING, Z.; BASSO, D.M. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. **Brain**. v.127, p.1403-1414, 2004.

JACKSON, A.B.; DIJKERS, M.; DEVIVIVO, M.;POCZATEK, R.B. A demographic profile of new traumatic spinal cord injuries: change and stability over 30 years. **Arch Phys Med Rehabil**. v.85, p.1740-8, 2004.

JEONG, S.R.; KWON, M.J.; LEE, H.G.; JOE, E.H.; LEE, J.H.; KIM, S.S.; SUH-KIM, H.; KIM, B.G. Hepatocyte growth factor reduces astrocytic scar formation and promotes axonal growth beyond glial scars after spinal cord injury. **Exp Neurol**. v.233(1), p.312-22, 2012.

KARIMI-ABDOLREAZAEE, S.; BILLAKANTI, R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury-beneficial and detrimental effects. **Mol Neurobiol.** v.46, n.2, p. 251-264, 2012.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G.C.; MASSIRONI, S.M.G.; PEREIRA, L.V.; CAPLAN, A.I.; CERRUTI, H.F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs.** v.184(3-4), p.105-116, 2006.

KIATPONGSAN, S.; SIPP, D. Medicine. Monitoring and regulating offshore stem cell clinics. **Science.** v. 323, p.1564-1565, 2009.

KIM, H. J.; LEE, J. H.; KIM, S. H. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. **Journal of Neurotrauma.** v. 27, n. 1, p. 131-138, 2010.

KUBASAK, M.D.; HEDLUND, E.; ROY, R.R.; CARPENTER, E.M.; EDGERTON, V.R.; PHELPS, P.E. L1 CAM expression is increased surrounding the lesion site in rats with complete spinal cord transection as neonates. **Exp. Neurol.** v.194, p. 363–75, 2005.

LI, Y.; CHEN, J.; WANG, L.; LU, M.; CHOPP, M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. **Neurology.** v.56, p.1666-1672, 2001.

LI, Y.; FIELD, P.M.; RAISMAN, G. Death of oligodendrocytes and microglial phagocytosis of myelin precede immigration of Schwann cells into the spinal cord **Journal of Neurocytology.** v.28, p. 417-427, 1999.

LI, W.T.; ZHANG, X.Y.; XUE, H.; NI, C.P.; WANG, E.G.; AN, L.B. Comparison of three different time points of starting treadmill training in spinal cord injured rats. **Dev Neurorehabil.** 2013. doi:10.3109/17518423.2012.762555.

LIU, M.; BOSE, P.; WALTER, G.A.; ANDERSON, D.K.; THOMPSON, F.J.; VANDERBORNE, K. Changes in T2 relaxation properties following spinal cord injury and locomotor training. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.97, p.335-361, 2006.

LOVELY, R.G.; GREGOR, R.J.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R. Effects of training on the recovery of full-weightbearing stepping in the adult spinal cat. **Exp. Neurol.** v.92, p. 421–435, 1986.

LUISI, S.B.; BARBACHAN, J.J.; CHIES, J.A.; FILHO, M.S. Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta1 and acidic fibroblast growth factor in culture. **J Endod.** v.33, n.7, p.833-835, 2007.

MACIAS, M.; NOWICKA, D.; CZUPRYN, A.; SULEJCZAK, D.; SKUP, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J.; CZARKOWASKA-BAUCH, J. Exercise-induced motor improvement after complete spinal cord transection and its relation to expression of brain-derived neurotrophic factor and presynaptic markers. **BMC Neurosci.** v.10, n.10, p. 144, 2009.

MAYNARD, F.M. Jr.; MICHAEL, B.B.; CREASEY, G.; DITUNNO, J.F. Jr; DONOVAN, W.H.; DUCKER, T.B.; GARBER, S.L.; MARINO, R.J.; STOVER, S.L.; TATOR, C.H.; WATERS, R.L.; WILBERGER, J.E.; YOUNG, W. International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury. **Spinal Cord.** v.35, p.266-274, 1997.

McDONALD, J. W.; BECKER, D.; HOLEKAMP, T. F.; HOWARD, M.; LIU, S.; LU, A.; LU, J.; PLATIKM M. M.; QU, Y.; STEWART, T.; VADIVELU, S. Repair of the Injured Spinal Cord and Potential of Embryonic Stem Cell Transplantation. **Journal of Neurotrauma.** v. 21, n. 4, p. 383-393, 2004.

McDONALD, J. W.; HOWARD, M. J. Repairing the Damaged Spinal Cord: A Summary of Our Early Success with Embryonic Stem Cell Transplantation and Remyelination. **Progress in Brain Research.** v. 137; p. 299-309, 2002.

McGEE, A.W.; STRITTMATTER, S.M. The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. **Trends Neurosci.** v.26, p.193–198, 2003.

MENEZES, K.; MENEZES, J.R.; NASCIMENTO, M.A.; SANTOS, R.S.; SAMPAIO, T.C. Poly laminin, a polymeric form of laminin, promotes regeneration after spinal cord injury. **FASEB.** v.24. p.4513-4522, 2010.

MESTRINER, R. G; PAGNUSSAT, A.S; BOISSERAND, L.S.B; VALENTIM, L; NETTO, C.A. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. **Experimental Neurology**, v.227, n.1, p.53-61. 2011.

MIRZA, S.K.; KRENGEL, W.F.; CHAPMAN, J.R.; ANDERSON, P.A.; BAILEY, J.C.; GRADY, M.S.; YUAN, H.A. Early and delayed surgery for acute cervical spinal cord injury. **Clin. Orthop.** v. 359, p. 104-114, 1999.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L.; ROBEY, P.; SHI, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **PNAS.** v.100, n.10, p. 5807–5812, 2003.

NAKAGAMI, H; MAEDA, K; MORISHITA, R; IGUCHI, S; NISHIKAWA, T; TAKAMI, Y; KIKUCHI, Y; SAITO, Y; TAMAI, K; OGIHARA, T; YASUFUMI K. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.25, n.12, p. 2542-2547, 2005.

NORENBERG, M.D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **J Neurotrauma.** v.21, p. 429–440, 2004.

OBERMAIR, F.J.; SCHROTER, A.; THALLMAIR, M. Endogenous neural progenitor cells as therapeutic target after spinal cord injury. **Physiology.** v. 23, p.296-304, 2008.

OGBORN, D.I.; GARDINER, P.F. Effects of exercise and muscle type on BDNF, NT-4/5, and TrKB expression in skeletal muscle. **Muscle Nerve**. v.41(3), p. 385-91, 2010.

OYINBO, C.A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal Cord injury: a nugget of this multiply cascade. **Acta Neurobiol Exp**. v.71 p. 281-299, 2011.

PARK,K.; LEE, Y.; PARK, S.; HONG, Y.; LEE, S.K. Synergistic effect of melatonin on exercise-induced neuronal reconstruction and functional recovery in a spinal cord injury animal model. **J. Pineal Research**. v.48, p.270-281, 2010.

PARK, S.; BYEON, Y.; RYU, H.; KANG, B.; KIM, Y.; KIM, W.; KANG, K.; HAN, H.; KWEON, O. Comparison of Canine Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Times: Involvement of Astrogliosis, Inflammation, Intracellular Actin Cytoskeleton Pathways, and Neurotrophin-3. **Cell Transplantation**. v. 20, p. 1867-1880, 2011.

PARR, A.M.; KULBATSKI, I.; ZAHIR, T.; WANG, X.; YUE, C.; KEATING, A.; TATOR, C.H. Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. **Neuroscience**. v.155, p. 760–770, 2008.

PEARSON, K.G.; ROSSIGNOL, S. Fictive motor patterns in chronic spinal cats. **J. Neurophysiol**. v.66, p.1874–1887, 1991.

PROFYRIS, C.; CHEEMA, S.S.; ZANG, D.; AZARI, M.F.; BOYLE, K.; PETRATOS, S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiol Dis**. v.15, p. 415–436, 2004.

RODRIGUES, L.P.; IGLESIAS, D.; NICOLA, F.C.; STEFFENS, D.; VALENTIM, L.; WITCZAK, A.; ZANATTA, G.; ACHAVAL, M.; PRANKE, P.; NETTO, C.A. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. **Braz. J. Med. Biol. Res**. v.45, n.1, p. 49-57, 2012.

ROWLAND, L. P. **Merritt - Tratado de Neurologia**. 10. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002.

SABATIER, M.J.; REDMON, N.; SCHWARTZ, G.; ENGLISH, A.W. Treadmill Training Promotes Axon Regeneration in Injured Peripheral Nerves. **Exp Neurol**. v. 211, p. 489–493, 2008.

SCADDEN, DT. The stem-cell niche as an entity of action. **Nature**. v. 441, p. 1075–1079, 2006.

SADAT, S.; GEHMERT, S.; SONG, Y.H.; YEN, Y.; BAI, X.; GAISER, S.; KLEIN, H.; ALT, E. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. v.363, n.3, p. 674-679, 2007.

SAKAI, K.; YAMAMOTO, A.; MATSUBARA, K.; NAKAMURA, S.; NARUSE, M.; YAMAGATA, M.; SAKAMOTO, K.; TAUCHI, R.; WAKAO, N.; IMAGAMA, S.; HIBI, H.; KADOMATSU, K.; ISHIGURO, N.; UEDA, M. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal Cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. **J Clin Invest**. v.112, n.1, p. 80-90, 2012.

SALAZAR, D.L.; UCHIDA, N.; HAMERS, F.P.; CUMMINGS, B.J.; ANDERSON, A.J. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in an early chronic spinal cord injury NOD-scid mouse model. **PLoS One**. v.5, n.8, p. e12272, 2010.

SANCHEZ-RAMOS, J.; SONG, S.; CARDOZO-PELAEZ, F.; HAZZI, C.; STEDEFORD, T.; WILLING, A.; FREEMAN, T. B.; SAPORTA, S.; JANSSEN, W.; PATEL, N. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Exp. Neurol**. v. 164, p. 247-256, 2000.

SANDROW-FEINBERG, H.R.; IZZI, J.; SHUMSKY, J.S.; ZHUKAREVA, V.; HOULE, J.D. Forced exercise as a rehabilitation strategy after unilateral cervical spinal cord contusion injury. **J Neurotrauma**. v.26, n.5, p. 721-731, 2009.

SCHMIDT, R.A.; LEE, T.D. **Motor Control and Learning: A Behavioural Emphasis**. 3a ed. Champaign, Ill: Human Kinetics: 1998.

SEALE, P.; RUDNICKI, M.A. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. **Dev Biol**. v.15, n.218, p.115-24, 2000.

SEGUAL, J.L.; GONZALES, E.; YOUSEFI, S.; JAMSHIDIPOUR, L.; BRUNNEMANN, S.R. Circulating levels of IL-2R, ICAM-1, and IL-6 in spinal cord injuries. **Arch Phys Med Rehab**. v.78, p. 44-47, 1997.

SHANTI, R.M.; LI, W.J.; NESTI, L.J.; WANG, X.; TUAN, R.S. Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.65, p. 1640-1647, 2007.

SHUMAN, S.L.; BRESNAHAN, J.C.; BEATTIE, M.S. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. **J. Neurosci. Res**. v.50, p. 798-808, 1997.

SILVER, J.; MILLER, J.H. Regeneration beyond the glial scar. **Nat. Rev. Neurosci**. v.5, n.2, p. 146–156, 2004.

SUMIDA, M.; FUGIMOTO, M.; TOKWIRO, A.; TOMINAGA, T.; MAGARA, A.; UCHIDA, R. Early Rehabilitation Effect for Traumatic Spinal Cord Injury. **Academy of Physical Medicine and Rehabilitation**. v. 82, p. 391-395, 2001.

TAGHIPOUR, Z.; KARBALAIE, K.; KIANI, A.; NIAPOUR, A.; BAHRAMIAN, H.; HOSSEIN, M.; BAHARVAND, H. Transplantation of Undifferentiated and Induced Human Exfoliated Deciduous Teeth-Derived Stem Cells Promote Functional Recovery of Rat Spinal Cord Contusion Injury Model. **Stem Cells and Development**. v.21, p. 1794-1802, 2012.

TATOR, C.H.; FEHLINGS, M.G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **J. Neurosurg.** v. 75, p. 15-26, 1991.

TETZLAFF, W.; OKON, E. B.; KARIMI-ABSOLREZAEI, S.; HILL, C. E.; SPARLING, J. S.; PLEMEL, J. R.; PLUNET, W. T.; TSAI, E. C.; BAPTISTE, D.; SMITHSON, L. J.; KAWAJA, M. D.; FEHLINGS, M. G.; KWON, B. K. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma.** v. 28, p.1611-1682, 2011.

THURET, S.; MOON, L. D.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nat. Rev. Neurosci.** v.7, p. 628–643, 2006.

VAN DE CROMMERT, H.; MULDER, T.; DUYSSENS, J. Neural control of locomotion: sensory control of the central pattern generator and its relation to treadmill training. **Gait Posture.** v.7, p.251–263, 1998.

VERFAILLIE, C. M. Multipotent adult progenitor cells: an update. **Novartis Found. Symp.** v.265, p. 92-97, 2005.

VISINTIN, M.; BARBEAU, H.; KOMER-BITENSKY, N.; MAYO, N.E. A new approach to retrain gait in stroke subjects through body weight support and treadmill stimulation. **Stroke.** v.29, p. 1122-1128, 1998.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell.** v. 116, p. 639-48, 2004.

WATERS, R.L.; WILBERGER, J.E.; YOUNG, W. International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury. **Spinal Cord.** v.35, p. 266-274, 1997.

WERNING, A.; MULLER, S.; NANASSY, A.; CAGOL, E. Laufband therapy based on “rules of spinal locomotion” is effective in spinal cord injured persons. **Eur. J. Neurosci.** v.7, p. 823–829, 1995.

WIRZ, M.; COLOMBO, G.; DIETZ, V. Long term effects of locomotor training in spinal humans. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. v.71, p. 93–96, 2001.

WISLET-GENDEBIEN, S.; LEPRINCE, P.; MOONEN, G.; REGISTER, B. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. **Journal of cell Science**. v. 116, n. 16, p. 3295-302, 2003.

WRATHALL, J. R.; WEN, L.; HUDSON, L. D. Myelin gene expression after experimental contusive spinal cord injury. **The Journal of Neuroscience**. v. 18, n. 21, p. 8780-8793, 1998.

WRIGHT, K.T.; MASRI, W.; OSMAN, A.; CHOWDHURY, J.; JOHNSON, W.E.B. Concise review: bone marrow for treatment of spinal cord injury: Mechanisms and clinical applications. **Stem Cells**. v. 29, p. 169-178, 2011.

WU, K.Y.; HONG, S.J.; LIN, C.P.; LAI, Y.H.; WANG, H.Z. Endothelin-induced changes of secondary messengers in cultured corneal endothelial cells. **J Ocul Pharmacol Ther**. v. 17, n. 4, p. 351-61, 2001.

YAMASHITA, Y.M.; MAHOWALD, A.P.; PERLIN, J.R.; FULLER, M.T. Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. **Science**. v.315, p. 518–521, 2007.

ZECH, N.H. Adult stem cell manipulation and possible clinical perspectives. **J. Reproduktionsmed. Endokrinol**. v.2, p. 91–99, 2004.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, H.M. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol. Biol. Cell**. v.13, p. 4279–4295, 2002.

ZURITA, M.; VAQUERO, J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. **Neuroreport**. v.15. p. 1105-1108, 2004.

ANEXOS

ANEXO A
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE DENTES DECÍDUOS PARA REALIZAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PARA O PROJETO DE PESQUISA: “Associação de exercício em esteira e células-tronco no tratamento da lesão medular experimental”.

Pesquisas recentes têm indicado que existem células-tronco no dente-de-leite (decíduos). O objetivo deste trabalho é utilizar as células dos dentes decíduos para derivar linhagens de células-tronco para uso em pesquisa básica, pré-clínica e clínica.

Toda e qualquer dúvida será esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa. Fica, ainda, assegurada a liberdade dos responsáveis pelo paciente, recusarem-se a participar do estudo. Não existe qualquer tipo de risco e/ou benefício na participação do programa. Não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum momento da pesquisa. O critério de inclusão dos doadores para essa pesquisa será os pacientes atendidos no setor de Odontologia Pediátrica da UFRGS que necessitam realizar procedimentos para remoção dos dentes decíduos. Esse delineamento será realizado pelo dentista responsável pela criança não havendo conexão com os pesquisadores desse projeto. Serão excluídos desse estudo os pacientes que necessitam remover outros dentes que não os decíduos. Para proteger a privacidade do paciente, a identidade não será revelada após a doação do dente nem para os pesquisadores envolvidos. Eu, _____ (responsável pelo paciente menor de idade), declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, estou de acordo com a participação nesse estudo e autorizo meu (minha) filho (a) ou criança pela qual sou responsável a participar do estudo, doar o dente depois da extração. O material coletado ficará armazenado ao longo do período de realização da pesquisa e ao final do período será descartado. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS que se localiza na Avenida Paulo Gama, 110 no 2º andar do prédio da Reitoria, telefone (51) 3308-3738.

Porto Alegre, ____ de _____ de 20__.

Responsável pelo Participante

Pesquisador Responsável:

RG: _____

RG: _____

Telefone de contato:

ANEXO B
Escala Basso, Beatie, e Bresnahan (BBB)

- 0 – Sem nenhum movimento nos membros posteriores (MP);
- 1 – Discreto movimento de uma ou duas articulações, normalmente o quadril e/ou joelho;
- 2 – Extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e discreto movimento de outra articulação;
- 3 – Extenso movimento de duas articulações do MP;
- 4 – Discreto movimento de mais de três articulações do MP;
- 5 – Discreto movimento de duas articulações e extenso movimento de uma terceira;
- 6 – Extenso movimento de duas articulações e discreto movimento de uma terceira ou extenso movimento de todas as três articulações do MP;
- 7 – Extenso movimento com nenhum suporte de peso ou colocação plantar da pata com nenhum suporte de peso;
- 8 – Apoio plantar da pata com suporte de peso em postura (quando parado) ou ocasional, frequente ou consistente suporte de peso na passada dorsal e nenhum apoio na passada plantar, movimentos suaves sem suportar o peso corporal;
- 9 – Ocasional suporte de peso na passada plantar, nenhuma coordenação dos membros anteriores (MA) e posteriores;
- 10 – Frequência constante do suporte de peso na passada plantar, nenhuma coordenação entre MA e MP;
- 11 – Frequência constante do suporte de peso na passada plantar e ocasional coordenação entre MA e MP;

12 – Frequência constante do suporte de peso na passada plantar e frequente coordenação entre MA e MP;

13 – Constante suporte de peso na passada plantar, constante coordenação entre MA e MP;

14 – Constante passada plantar e constante coordenação entre MA e MP e predominância da posição das patas em rotação (interna ou externa) quando começa o contato inicial com a superfície antes mesmo de levantar no fim da postura ou frequente passada plantar, constante coordenação entre MA e MP e ocasional passada dorsal;

15 – Constante passada plantar constante coordenação entre MA e MP; e nenhum movimento dos dedos das patas ou ocasional movimento dos dedos das patas durante o avanço do membro seguinte. Predominantemente posição da pata, paralela ao corpo no contato inicial;

16 – Constante passada plantar e constante coordenação entre MA e MP durante o andar; a liberação dos dedos das patas ocorrem frequentemente durante o avançar dos membros dianteiros. Predominantemente, as patas estão paralelas no contato inicial e rodadas ao se levantar;

17 – Constante passada plantar e constante coordenação entre MA e MP durante o andar; e a liberação dos dedos das patas ocorrem frequentemente durante o avançar dos membros dianteiros predominantemente as patas estão paralelas no contato inicial e ao levantar-se;

18 – Constante passada e constante coordenação entre MA e MP durante o andar, a liberação dos dedos das patas ocorrem constantemente durante o avançar dos membros dianteiros predominantemente as patas estão paralelas no contato inicial e rodadas ao levantar-se;

19 – Constante passada plantar e constante coordenação entre MA e MP durante o andar, a liberação dos dedos das patas ocorrem constantemente durante o avançar dos membros dianteiros predominantemente as patas estão paralelas no contato inicial e ao levantar-se. A cauda mantém-se para baixo todo o tempo ou apenas parte dela;

20 – Constante passada plantar e constante coordenação ao andar, constantes movimentos livres dos dedos das patas, predominantemente as patas estão paralelas no contato inicial e ao levantar-se; e instabilidade do tronco. Cauda constantemente elevada;

21- Constante passada plantar e andar coordenado, constantes movimentos livres das patas, as patas predominantemente estão paralelas durante a postura. Constante estabilidade de tronco, cauda constantemente elevada.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma*. v.12 (1), p.1-21, 1995.