

Gustavo Ieno Judas

**Efeito da injeção intratecal de células tronco do
cordão umbilical humano na lesão isquêmica da
medula espinhal em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Judas, Gustavo Ieno

Efeito da injeção intratecal de células tronco do cordão umbilical humano na lesão isquêmica da medula espinhal em ratos / Gustavo Ieno Judas. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Luiz Felipe Pinho Moreira.

Descritores: 1.Doenças da aorta/cirurgia 2.Aneurisma da aorta torácica
3.Complicações pós-operatórias/terapia 4.Isquemia do cordão espinhal
5.Paraplegia 6.Células-tronco 7.Ratos Wistar

Dedicatória

À Juliana, minha amada esposa, que com alegria, solidariedade e amor me incentiva e fortalece em cada novo desafio.

Aos meus filhos, Otávio e Bruna, fonte de inspiração e verdadeiro sentido da vida.

À minha irmã, Fabiana, e aos meus pais, Enrique e Ana, pelo exemplo de perseverança e caráter.

A Nossa Senhora Aparecida, pela fé.

Agradecimentos especiais

*Ao Professor Doutor Luiz Felipe Pinho Moreira pela dedicação, orientação e
sábios conselhos indispensáveis à minha formação acadêmica.*

*Ao Professor Doutor Sérgio Almeida de Oliveira pelo exemplo de pessoa e
médico.*

Agradecimentos

Ao Professor Noedir Stolf pelo entusiasmo na idealização e viabilização do projeto.

Ao Professor Fábio Biscegli Jatene grande incentivador da ciência e do engrandecimento da Universidade como instituição.

À Professora Paulina Sannomyia pela gentileza, jovialidade e contribuição científica.

Ao Professor Luiz Fernando Ferraz da Silva por viabilizar as análises histológicas do projeto.

À banca de qualificação: Professor Doutor Luís Alberto de Oliveira Dallan, Professor Doutor Luís Augusto Ferreira Lisboa e Doutor Anderson Benício, pela construtiva discussão e sugestões que, seguramente, melhoraram a qualidade desta tese.

Ao Doutor Anderson Benício, pelo auxílio na elaboração e realização do projeto.

À minha esposa Juliana pelo apoio, incentivo e paciência nos períodos de ausência da nossa família.

A meus filhos Otávio e Bruna, pelo carinho, muitas vezes não correspondido à altura que mereciam.

A meus avós, que mesmo não presentes seguem olhando por mim.

A toda minha família em especial à minha mãe Ana, meu pai Enrique, e minha irmã Fabiana, minha sogra Cleide, meu sogro Bruno e meus cunhados Marcela e Alexei pelo apoio e incentivo. Também a meus afilhados Antônio e Bruno.

Ao amigo Marco Antônio Praça de Oliveira pelo incentivo, apoio e dedicação ao trabalho de todos os dias.

À bióloga Sueli Ferreira, mais do que uma batalhadora no auxílio à execução dos experimentos, teve a serenidade e a paciência de persistir frente às adversidades.

Ao amigo e Doutor Rafael Simas, grande companheiro, sempre solícito e decisivo nos momentos difíceis e a sua noiva Laura.

A todos os amigos do LIM 11, Cristiano Correia, Leila Peralta, Sérgio Sales e Clebson Ferreira, pela dedicação ao estudo.

A todos os colegas e membros da equipe Sérgio Almeida de Oliveira, especialmente aos doutores Israel Ferreira da Silva, João Antonio Vieira e Hamiltom Marques Gatinho pelo competente cuidado aos doentes.

A todos os amigos de doutorado, em especial ao Doutor Isaac Azevedo Silva, por compartilharem as dúvidas e angústias dessa jornada.

Aos laboratórios de inflamação do INCOR e de patologia da FMUSP pelo auxílio nas análises imunohistoquímicas.

Ao laboratório Cryopraxis pelo fornecimento das células-tronco.

Às funcionárias da pós-graduação do Instituto do Coração, Neusa, Juliana e Eva, pela afabilidade e eficiência com que fazem seu trabalho.

À FAPESP, pelo reconhecimento científico e suporte financeiro na compra de materiais imprescindíveis para o desenvolvimento da tese.

Epígrafe

*“Muito melhor a resposta aproximada para
a pergunta certa, que muitas vezes é vaga,
do que a resposta certa para a pergunta errada,
que sempre pode ser acertada.”*

John W. Tukey (1962)

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO	1
ASPECTOS GERAIS DA LITERATURA	5
Fisiopatologia da lesão medular isquêmica	5
Métodos de proteção medular.....	8
Modelos experimentais de lesão medular isquêmica	12
Mecanismos de atuação das células-tronco na lesão da medula espinhal ...	14
Uso de células-tronco na lesão isquêmica da medula espinhal	16
Células do cordão umbilical humano na lesão da medula espinhal	18
OBJETIVOS.....	20
MÉTODOS	21
Grupos experimentais	22
Obtenção das células-tronco.....	24
Anestesia e preparo cirúrgico.....	24

Parâmetros hemodinâmicos e gasométricos	25
Laminectomia e injeção intratecal	26
Indução da isquemia medular	26
Preparo das amostras criopreservadas	28
Cuidados pós-operatórios e analgesia	28
Avaliação da função locomotora	29
Eutanásia e coleta de material biológico	29
Análise morfométrica dos neurônios viáveis e necróticos	30
Imunohistoquímica para quantificação de células nervosas em processo de apoptose - TUNEL	31
Imunohistoquímica para a detecção e quantificação de células humanas hematopoiéticas CD45 ⁺ na medula espinhal	32
Análise estatística	32
RESULTADOS	34
Avaliação da função motora	35
Avaliação morfométrica dos neurônios viáveis e necróticos	36
Avaliação imunohistoquímica para quantificação de células nervosas em processo de apoptose	37
Avaliação imunohistoquímica para a detecção e quantificação de células humanas hematopoiéticas CD45 ⁺ na medula espinhal	38
DISCUSSÃO	40

CONCLUSÕES	45
ANEXOS	46
REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração de eventos que levam à lesão axonal	5
Figura 2.	Sistema arterial anterior da medula espinhal de ratos	13
Figura 3.	Potenciais efeitos das células-tronco no reparo da medula espinhal	15
Figura 4.	Protocolo experimental	23
Figura 5.	Representação esquemática do modelo cirúrgico	27
Figura 6.	Avaliação da função locomotora	36
Figura 7.	Quantificação de neurônios viáveis	37
Figura 8.	Avaliação do processo apoptótico	38
Figura 9.	Quantificação de células CD45 ⁺	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de pressão arterial média distal dos grupos durante os procedimentos experimentais35
- Tabela 2.** Valores de pressão arterial média proximal dos grupos durante os procedimentos experimentais35

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Tri-Fosfato
BBB	Basso, Beattie, Bresnahan
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
Cpós	Controle Pós
Cpré	Controle Pré
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro Padrão da Média
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
FiO ₂	Fração Inspirada de Oxigênio
H&E	Hematoxilina e Eosina
LIM-11	Laboratório de Investigação Médica -11
PAP	Pressão Arterial Proximal
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Politetrafluoretileno
PEM	Potencial Evocado-Motor
PESS	Potencial Evocado Somato-sensitivo

SCUP	Sangue do Cordão Umbilical Placentário
SDC	Serviço de Documentação Científica
Tcp ^{pré}	Tratamento com Células Pré
Tcp ^{ós}	Tratamento com Células Pós
Tris - HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling</i>

Resumo

RESUMO

Judas GI. *Efeito da injeção intratecal de células tronco do cordão umbilical humano na lesão isquêmica da medula espinhal em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A isquemia da medula espinhal continua sendo uma importante complicação nas cirurgias das doenças da aorta descendente torácica e toracoabdominal. **OBJETIVOS:** Células-tronco são capazes de promover a regeneração do tecido nervoso. Células-tronco derivadas do cordão umbilical humano (CTCUH) são fortes candidatas para uso nas lesões da medula espinhal devido à sua baixa imunogenicidade e pronta disponibilidade. O estudo avaliou os efeitos da administração de CTCUH na lesão isquêmica da medula espinhal em ratos. **MÉTODOS:** Quarenta ratos *Wistar* receberam injeção intratecal de 10 μ L de solução de HemoHes (6 %) e albumina humana (20 %) contendo 1×10^4 CTCUH, 30 minutos antes (grupo Tcpré; n=10) e 30 minutos após (grupo Tcpós n=10) oclusão da aorta torácica descendente através de um balão intraluminal por 12 minutos. Os grupos controle receberam apenas a solução de HemoHes (6 %) e albumina humana (20 %) (grupo Cpré; n=10 e grupo Cpós; n=10). O período observacional, para avaliação da função motora dos animais, foi de 28 dias. Cortes de três segmentos tóraco-lombares da medula espinhal foram submetidos à análise histológica e imunohistoquímica para detecção de apoptose (TUNEL) e quantificação de células-tronco humanas hematopoiéticas CD45⁺. **RESULTADOS:** Todos os grupos mostraram incidência semelhante de paraplegia e mortalidade. A média de pontuação da função motora não mostrou diferença durante o período observacional nos grupos, com exceção do grupo Tcpós o qual melhorou de $8,14 \pm 8,6$ para $14,28 \pm 9,8$ ($p < 0,01$). Número de neurônios viáveis foi maior no grupo Tcpós ($p = 0,14$) e a média de apoptose foi mais baixa nesse mesmo grupo ($p = 0,048$), porém sem diferença estatística significativa em relação ao controle. Foi confirmada a presença de células CD45⁺ quatro semanas após a injeção intratecal em ambos os grupos terapêuticos, principalmente, no grupo Tcpós. **CONCLUSÕES:** A injeção intratecal de CTCUH é factível e melhora a função motora da medula espinhal em um modelo de oclusão endovascular da aorta torácica descendente.

Descritores: Doenças da aorta/cirurgia; Aneurisma da aorta torácica; Complicações pós-operatórias/terapia; Isquemia do cordão espinhal; Paraplegia; Células-tronco; Ratos *Wistar*.

Summary

SUMMARY

Judas GI. *Effect of intrathecal injection of human umbilical cord blood stem cells in spinal cord ischemic compromise in rats* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2013.

BACKGROUND: Spinal cord ischemia remains a complication after surgical repair of descending and thoracoabdominal aortic diseases. **OBJECTIVES:** Stem cells have the potential to induce nervous tissue regeneration processes. Human stem cells derived from the umbilical cord are one of strong candidates used in cell therapy for spinal cord injury due to weak immunogenicity and ready availability. We sought to evaluate the use of Human Umbilical Cord Blood Stem Cells (HUCBSC) attenuates the neurologic effects of spinal cord ischemia. **METHODS:** Fourty *Wistar* rats received intrathecally injection of 10 μ L Hemohees (6 %) and human albumin (20 %) solution contained 1×10^4 HUCBSC, 30 minutes before (Tcpré group; n=10) and 30 minutes after (Tcpós group; n=10) descending thoracic aortic occlusion by intraluminal balloon during 12 minutes. Control groups received only PBS solution (Cpré group; n=10 and Cpós group; n=10). During a 28-day observational period, animals motor function was assessed. Three segments of thoraco-lombar spinal cord specimens were analyzed for histologic and immunohistochemical assessment for detection and quantification of human hematopoietic cells CD45⁺ and apoptosis (TUNEL). **RESULTS:** All groups showed similar incidence of paraplegia and mortality. The mean motor function scores showed no difference during time, excepting for Tpos group which improved from 8.14(8.6) to 14.28(9.8)($p < 0,01$). Number of viable neurons was higher in Tcpós group ($p = 0.14$) and apoptosis average was lower in the same animals ($p = 0.048$), but showed no difference with its respective control. We confirmed the presence of CD45⁺ cells four weeks after intrathecal injection in both therapeutic groups but mainly in Tpos group. **CONCLUSIONS:** Intrathecal transplantation of HUCBSC is feasible and improved spinal cord function in a model of endovascular descending aortic occlusion.

Descriptors: Aortic diseases/surgery; Aortic aneurysm, thoracic; Postoperative complications/therapy; Spinal cord ischemia; Paraplegia; Stem cells; Rats, *Wistar*.

Introdução

INTRODUÇÃO

A proteção da medula espinhal permanece como o aspecto mais controverso e problemático nas cirurgias das doenças da aorta descendente torácica e toracoabdominal. Apesar dos avanços que possibilitam uma abordagem cada vez mais segura dessas doenças, os procedimentos cirúrgicos continuam a apresentar altas taxas de morbi-mortalidade.

A paraplegia é a complicação mais devastadora; sua incidência varia de 6,6 % a 8,3 % em pacientes com aneurismas toracoabdominais^{1,2} chegando até 16% considerando também outras afecções desse território^{3,4}. O caráter incapacitante e irreversível dessa complicação representa um desafio aos cirurgiões que procuram estabelecer métodos capazes de não apenas prevenir, mas também diagnosticar e tratar precocemente alterações isquêmicas da medula espinhal evitando, assim, suas sequelas.

Embora diversas medidas, para prevenir a lesão isquêmica da medula espinhal, sejam estabelecidas no intra e no pós-operatório, ainda há muita controvérsia a respeito da eficácia desses procedimentos. O caráter multifatorial do desenvolvimento da paraplegia, a variabilidade quanto ao aspecto anatômico e a dificuldade em se estabelecer modelos fisiopatológicos confiáveis para o entendimento da lesão medular, são fatores determinantes da complexidade na abordagem dessa complicação.

Com o advento das células-tronco, cresceu o interesse no seu uso como agente terapêutico em lesões neurológicas devido à limitada capacidade de

regeneração desse tecido. Nas duas últimas décadas, diversas publicações têm buscado o potencial terapêutico de diferentes tipos de células-tronco na disfunção da medula espinhal. Estudos contemplando o uso dessas células em modelos de lesão medular traumática⁵⁻⁹, lesões químicas¹⁰, lesões degenerativas¹¹⁻¹³ e lesões isquêmicas¹⁴⁻¹⁸, têm sido publicados. Em geral, esses estudos mostram um padrão de sobrevivência e preservação em longo prazo do fenótipo neuronal, quando se utilizam enxertos precursores gerados a partir de tecido fetal^{10,17,19} e, dependendo do modelo de lesão medular, um grau variável de recuperação tem sido observado⁸.

Particularmente nas lesões isquêmicas da medula espinhal, o uso de células-tronco embrionárias humanas evidencia diferenciação em um fenótipo neuronal específico, capaz de melhorar a função motora de ratos com paraplegia espástica¹⁴. Outros estudos ressaltaram que a liberação de fatores neurotróficos pelas células enxertadas seriam capazes de promover a remielinização de oligodendrócitos, incrementar a proliferação dos astrócitos e estimular o surgimento de novas fibras nervosas, o que contribuiria para a melhora da função neurológica¹⁷. Park e colaboradores comprovaram a capacidade das células-tronco embrionárias, e suas derivadas, de produzirem substâncias neuroquimicamente ativas, capazes de mediar a reposta inflamatória e exercer atividade terapêutica nas lesões do sistema nervoso central²⁰.

Devido às dificuldades de obtenção das células-tronco embrionárias, duas fontes alternativas de células-tronco não embrionárias vêm recebendo grande atenção no tratamento de desordens neurológicas: células-tronco

derivadas da medula óssea e células-tronco do cordão umbilical humano^{21,22}. Células-tronco derivadas da medula óssea já haviam evidenciado redução da área de infarto e melhora funcional em modelos experimentais de isquemia cerebral^{23,24}. Essas células também apresentaram benefícios no tratamento de medulas espinhais com lesão traumática^{25,26}.

Em modelo de isquemia da medula espinhal em coelhos e injeção intratecal de células-tronco derivadas da medula óssea, dois dias antes da indução da lesão, foi demonstrada a atenuação do déficit neurológico dos animais. Tal benefício foi acompanhado da migração das células, preferencialmente para as áreas de isquemia, além da sobrevivência e incorporação dos enxertos por, pelo menos, quatorze dias¹⁶. Em outro estudo, quando essas células foram administradas em três momentos diferentes: 30 minutos, 24 e 48 horas após a indução da isquemia, observou-se aumento no número de neurônios intactos com consequente melhora do déficit motor nos animais que receberam as células nos dois primeiros momentos, o que não se repetiu com 48 horas¹⁸.

Desde 1989, células-tronco do cordão umbilical humano têm sido consideradas uma alternativa à utilização de células-tronco da medula óssea, principalmente em modelos experimentais. Além do fato de serem facilmente disponíveis, células-tronco do cordão umbilical humano podem ser consideradas melhores candidatas no tratamento de lesões da medula espinhal, devido à baixa imunogenicidade²⁷.

O transplante intra-espinhal de células-tronco CD34⁺ do cordão umbilical humano melhora a função motora dos membros posteriores de ratos adultos

submetidos tanto à hemiseção quanto à contusão da medula espinhal²⁸. Saporta e colaboradores demonstraram que a infusão endovenosa de células-tronco do cordão umbilical humano, com linhagens não fracionadas, melhora a função motora de ratos submetidos à compressão da medula espinhal²⁹.

Em modelo de isquemia cerebral, demonstrou-se que o uso de linhagens hematopoiéticas de células-tronco do cordão umbilical humano reduz a área de lesão, melhora a regeneração e/ou preservação dos axônios com melhora clínica dos animais, a despeito de não ter sido evidenciada diferenciação dessas células em linhagem neuronal³⁰. Recentemente, demonstrou-se que a administração intratecal dessas células é factível e que as mesmas são capazes de migrar e minimizar a lesão cerebral isquêmica³¹.

Aspectos gerais da literatura

ASPECTOS GERAIS DA LITERATURA

Fisiopatologia da lesão medular isquêmica

Em condições de isquemia da medula espinhal as reservas de ATP das células nervosas são rapidamente depletadas, levando à falência da bomba de sódio e potássio ATPase e, através da abertura persistente dos canais, os íons sódio acumulam-se no espaço citoplasmático (axoplasma). O acúmulo desses íons ativa a bomba de sódio e cálcio, que passa a operar em sentido reverso, aumentando a concentração intracelular de cálcio, o que pode causar lesões irreversíveis através da ativação exacerbada de sistemas cálcio-dependentes, tais como lipases e proteína-quinases³² (Figura 1).

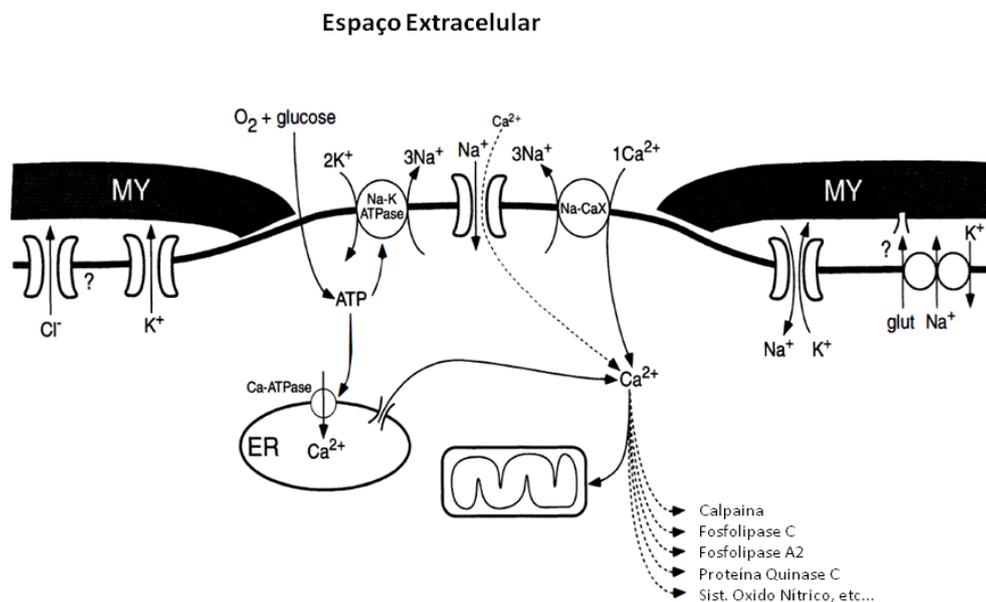


Figura 1. Ilustração da sequência de eventos inter-relacionados que levam à lesão isquêmica de um axônio central mielinizado. As localizações dos vários canais iônicos e transportadores foram desenhados por conveniência e não necessariamente refletem sua real distribuição MY – bainha de mielina; ER – retículo endoplasmático. Adaptado de Stys, 1998³².

A isquemia da medula espinhal tem como via final a morte celular, formação de tecido cicatricial e perda da função. No entanto, o mecanismo fisiopatológico da lesão é apenas parcialmente compreendido. Tal processo envolve desde a liberação de prostaglandinas, radicais livres e aminoácidos excitatórios³³⁻³⁸, até alterações neuro-degenerativas pan-necróticas, afetando tanto interneurônios inibitórios quanto excitatórios, bem como motoneurônios ventrais³⁹.

A análise histopatológica da medula espinhal, oriunda de animais com lesão isquêmica e déficit motor caracterizado por rigidez e espasticidade, demonstra perda seletiva de pequenos neurônios inibitórios e persistência de α -motoneurônios viáveis em segmentos isquêmicos da coluna, fisiopatologia semelhante àquela da lesão medular traumática. Em contraste, animais também submetidos à interrupção do fluxo sanguíneo da aorta descendente, porém por períodos mais longos, são acometidos por paraplegia flácida e exibem alterações histológicas pan-necróticas^{14,40,41}.

À semelhança da isquemia cerebral, a ativação da lesão isquêmica na medula espinhal depende da microglia local e da infiltração de macrófagos. Dependendo da extensão da lesão, o pico das alterações inflamatórias é observado entre dois e três dias após a isquemia regredindo entre duas e três semanas⁴².

Stys demonstrou que a degeneração neuronal pode ser mediada por receptores presentes em oligodendrócitos e astrócitos, quando a medula é exposta à isquemia transitória. A perda de células gliais, mesmo na ausência

de significativa degeneração neuronal, pode levar a alteração da condutividade segmentar com consequente perda da função³⁸.

Métodos de proteção medular

A redução na pressão de perfusão da medula espinhal, após a oclusão temporária da aorta torácica, é um dos fatores mais importantes na fisiopatologia da lesão medular isquêmica⁴³. Vários métodos de proteção medular têm sido propostos, porém nenhum, de maneira isolada, foi capaz de abolir o problema. Uma combinação dos diferentes métodos de proteção parece ser a abordagem mais efetiva na redução do risco da lesão medular isquêmica.

O suprimento sanguíneo da medula espinhal provém da artéria espinhal anterior e de duas artérias espinhais posteriores. A artéria espinhal anterior é frequentemente incompleta, particularmente nas áreas mais baixas do tórax, o que torna a perfusão nesta região dependente da artéria radicular Magna ou artéria de Adamkiewicz^{44,45}. Além disso, há pouca comunicação entre a artéria espinhal anterior e as artérias posteriores, tornando a perfusão do corno anterior da medula espinhal dependente, exclusivamente, da primeira. Tal disposição anatômica tem participação fundamental no desenvolvimento da lesão medular isquêmica⁴⁶.

O reimplante da maior parte das artérias intercostais e lombares surgiu como uma tentativa óbvia de diminuir a incidência da lesão medular isquêmica. No entanto, em uma série de 605 pacientes submetidos ao reimplante máximo dessas artérias, verificou-se um aumento do risco de lesão, provavelmente devido ao maior tempo de clampeamento aórtico³. Embora períodos mais curtos de clampeamento aórtico possam diminuir a ocorrência de paraplegia,

alguns pacientes, com tempo de clampeamento inferior a 30 minutos, podem apresentar tal complicação. A variabilidade quanto ao local de estreitamento da artéria espinhal anterior pode estar relacionada à ocorrência da lesão isquêmica nesses pacientes^{1,47}.

Com base em um melhor conhecimento do suprimento sanguíneo da medula espinhal e avanço nos métodos de imagem, foi possível determinar o ponto de estreitamento da artéria espinhal anterior⁴⁸ e restringir o reimplante das artérias radiculares apenas em torno do nível T11/T12⁴⁹. Contudo, considerar a fisiopatologia da lesão medular isquêmica com base, apenas, na disposição anatômica do suprimento sanguíneo seria simplista e insuficiente para determinar a sua ocorrência.

A utilização do potencial evocado somato-sensitivo (PESS) e do potencial evocado-motor (PEM), durante a cirurgia, são métodos estabelecidos que podem auxiliar na determinação do adequado fluxo sanguíneo para a medula espinhal. O PESS, que reflete a condução da informação sensorial do corno posterior da medula, um dos últimos territórios a sofrer isquemia, tem sua utilização clínica limitada na detecção precoce de eventos isquêmicos. Por outro lado, a monitorização do PEM provou-se útil como método auxiliar na tomada de decisões em relação ao tempo de intervenção na isquemia medular⁵⁰. Como método isolado para a proteção isquêmica da medula, essa monitorização apresenta ocorrência, não desprezível, de resultados falsos positivos, principalmente sob efeito de alguns tipos de anestésicos^{51,52}.

O resfriamento da medula espinhal, tanto pela injeção de solução salina gelada (4°C) no espaço epidural⁵³, quanto de modo sistêmico, é uma possível

medida protetora da isquemia. Em uma série de 334 casos de aneurismas toracoabdominais, Cambria e colaboradores publicaram bons resultados inerentes ao uso da hipotermia regional, os quais reduziram a incidência da lesão neurológica de 19,8 % para 10,6 %⁴⁷. O tempo necessário para o resfriamento, apenas do espaço epidural, é um fator complicador do procedimento⁴³. Os mesmos efeitos podem ser obtidos pela hipotermia sistêmica profunda, porém associada com um aumento das complicações hemorrágicas e pulmonares³.

A pressão de perfusão da medula espinhal é função direta da pressão arterial média e da pressão do fluido cerebrospinal. Logo após o clampeamento aórtico ocorre aumento da produção de fluido cerebrospinal e, conseqüente, aumento da pressão intratecal. Com a concomitante diminuição da pressão arterial nos vasos que irrigam a medula espinhal, cria-se um ambiente propício à lesão isquêmica. A drenagem do fluido cerebrospinal é capaz de reduzir a pressão intratecal e melhorar a perfusão medular. Em estudos prospectivos e randomizados, demonstrou-se redução de 80 % no risco relativo de ocorrência de déficit neurológico em doentes submetidos à correção de aneurismas toracoabdominais do tipo I e II⁵⁴ e diminuição da incidência de lesão isquêmica da medula espinhal de 13 % para 2,6 %². Contudo, essa técnica não é isenta de riscos, como destacado em estudo recente, com 486 pacientes, submetidos ao reparo de aneurismas toracoabdominais. Complicações neurológicas atribuídas à própria drenagem, incluindo-se hemorragia intracraniana, ocorrem em 1 % dos pacientes⁵⁵.

O uso do suporte circulatório esquerdo foi proposto com o intuito de manter a perfusão retrógrada da medula espinhal e dos órgãos viscerais. Utilizando-se a assistência ventricular esquerda em mais de 1000 pacientes, submetidos ao reparo de aneurismas toracoabdominais do tipo II, houve uma redução de 11,2 % para 4,5 % na incidência de paraplegia ou paraparesia^{56,57}. Porém, o uso da assistência esquerda aumenta o tempo de clampeamento aórtico e o risco de coagulopatia, principalmente em pacientes com extensas áreas de dissecação. Adicionalmente, o clampeamento aórtico seriado nem sempre é possível, particularmente em grandes aneurismas do tipo II⁵⁸.

Modelos experimentais de lesão medular isquêmica

No intuito de entender melhor os mecanismos responsáveis pela lesão medular isquêmica e propor medidas terapêuticas, diversos modelos animais têm sido propostos⁵⁹. No entanto, todos com limitações quanto ao uso para testes pré-clínicos ou para a compreensão do processo fisiopatológico^{60,61}.

A anatomia vascular da medula espinhal dos ratos é semelhante à de humanos, com poucas artérias radiculares alcançando a artéria espinhal anterior⁵⁹ (Figura 2). Essa característica anatômica permite considerar que o mecanismo de paraplegia isquêmica, induzido pela oclusão alta da aorta torácica em ratos é preditivo da disfunção que acomete pacientes submetidos ao reparo cirúrgico da aorta torácica descendente ou toracoabdominal^{62,63}.

Um dos primeiros modelos de isquemia medular publicado em ratos, proposto por Taira e Marsala em 1996⁴¹, consistia em uma oclusão da aorta descendente em conjunto com a artéria subclávia. O controle da pressão proximal era feito através da drenagem do sangue pela artéria femoral e reinjeção após o término da isquemia, ou a qualquer tempo, durante a isquemia, caso a pressão proximal apresentasse uma queda abaixo dos valores pré-estabelecidos. Trata-se de uma técnica que resulta em alta incidência de lesões medulares graves, porém acompanhada de altas taxas de mortalidade durante o procedimento ou após as primeiras horas. Pelos poucos trabalhos publicados por outros autores, excetuando-se os do próprio grupo, infere-se a falta de reprodutibilidade do modelo.

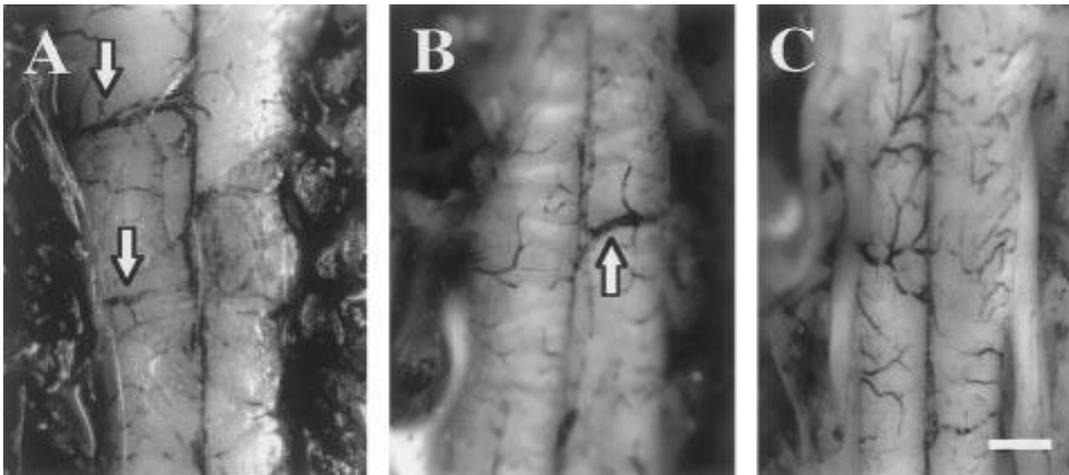


Figura 2. Perfusão com carbono negro do sistema arterial anterior da medula espinhal de ratos em diferentes níveis. Fotomicrografias do nível cervical (A) mostram duas artérias radiculares provenientes do lado direito (setas) suprindo a artéria espinhal anterior. No nível toracolombar (B) a artéria espinhal anterior é suprida por um único vaso (equivalente a artéria de Adamkiewicz em humanos) proveniente do lado esquerdo no altura de T10. O “conus medullaris” ou cauda equina (C) contém uma rica rede vascular suprida tanto pela artéria espinhal anterior quanto pela artéria espinhal posterior. Adaptado de Lang-Lazdunski *et al.*, 2000⁵⁹.

Lang-Lazdunski e colaboradores relataram uma incidência de 60 % de paraplegia grave em camundongos submetidos à toracotomia e ao clampeamento direto da aorta torácica, com a ressalva do período de avaliação ter sido limitado a 48 horas⁵⁹. Em modelo semelhante, com parâmetros cirúrgicos otimizados, Awad e seus colaboradores demonstraram uma melhor sobrevida e incidência de lesão neurológica grave em dois terços dos animais, os demais apresentaram relativa resistência à isquemia⁶⁴.

Portanto, assim como na prática clínica, um mesmo modelo experimental pode apresentar grande variabilidade na incidência de lesão isquêmica da medula espinhal, sendo influenciada por variáveis como: tempo de clampeamento, nível de oclusão da aorta descendente, anatomia do animal e temperatura corporal.

Mecanismos de atuação das células-tronco na lesão da medula espinhal

As tentativas de atenuar a lesão da medula espinhal com o transplante de células-tronco começaram há cerca de duas décadas em modelos de lesão medular traumática. Vários estudos indicam um papel benéfico no transplante de células-tronco nesse tipo de lesão. Contudo, permanecem dúvidas a respeito do verdadeiro mecanismo de atuação dessas células.

Uma das possibilidades seria a substituição das células nervosas perdidas pelas células-tronco transplantadas. Esse seria um importante mecanismo de atuação, principalmente em situações nas quais ocorrem perdas significativas de neurônios e oligodendrócitos⁶⁵. No entanto, também foram reportados benefícios funcionais sem qualquer substituição de células neurais com o uso de células-tronco mesenquimais. Nesse contexto, o mecanismo de atuação parece ser indireto através de suporte trófico, modulando a resposta inflamatória ou fornecendo um substrato para o crescimento axonal⁶⁶.

Outras evidências indicam que células-tronco, independente da sua origem, derivação e potencial de diferenciação *in vivo*, podem promover uma recuperação do tecido nervoso através da secreção de neurotrofinas. Tais substâncias são capazes de repararem as células lesadas através da ativação, *in situ*, de fatores de crescimento, moléculas de orientação e outros estímulos para diferenciação/proliferação de células progenitoras endógenas e liberação de citocinas angiogênicas e imunomoduladoras²³. Portanto, as estratégias de tratamento com células-tronco podem ser consideradas, em alguns casos,

terapêuticas combinadas, oferecendo tanto benefícios neurotróficos quanto fenotípicos⁶⁷.

É mister ressaltar que a substituição de células nervosas pode ser favorecida através da pré-diferenciação das células-tronco em uma linhagem celular desejada. Lembrando que, até o momento, existem poucos métodos capazes de diferenciar tais células em populações específicas^{67,68} (Figura 3).

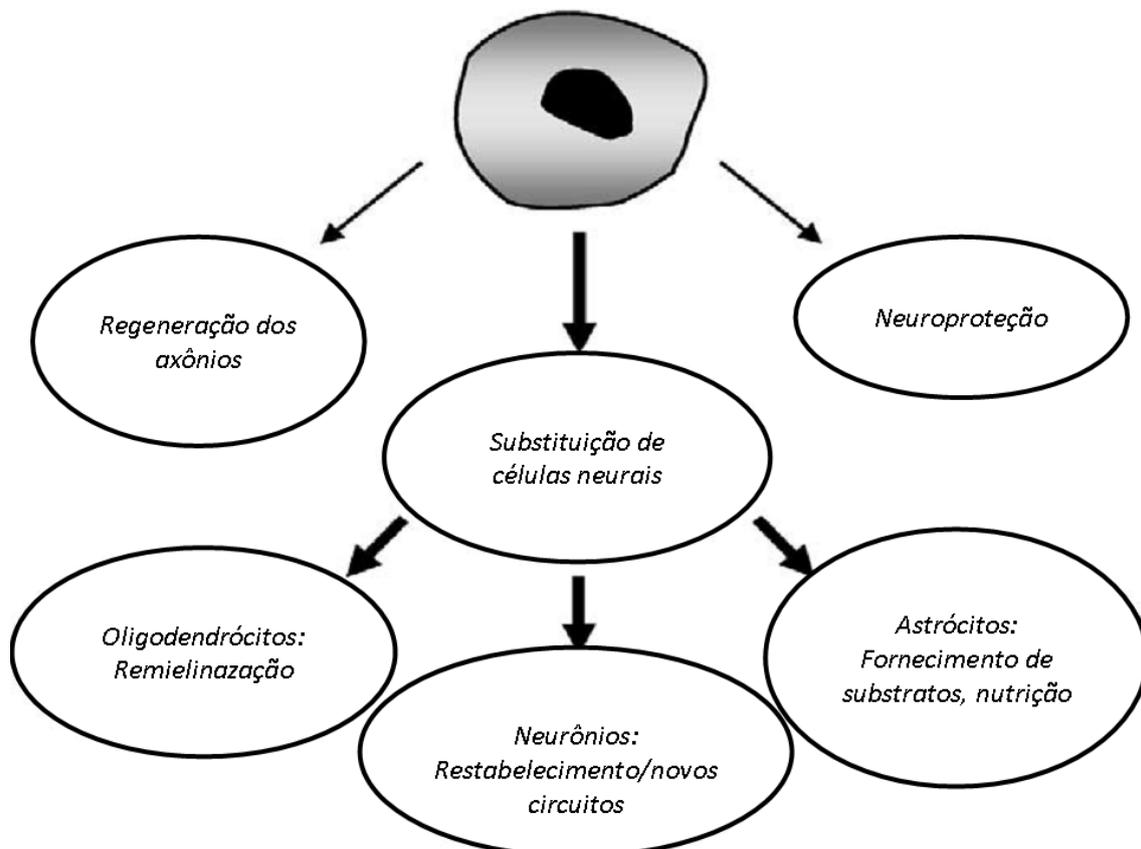


Figura 3. Potenciais efeitos das células-tronco no reparo da lesão da medula espinhal. Adaptado de Nandoe *et al.*, 2009⁶⁸.

Uso de células-tronco na lesão isquêmica da medula espinhal

Marsala e colaboradores, em 2004, trabalhando com células humanas de um teratocarcinoma, pré-diferenciadas em linhagem neuronal, e enxertadas diretamente na medula de ratos com lesão isquêmica espástica, demonstraram melhora na evolução neurológica ao longo de doze semanas. Tal recuperação foi acompanhada de maturação das células enxertadas e do desenvolvimento de um fenótipo de neurônios GABAérgicos¹⁴. Em outro estudo, do mesmo grupo, foram observados resultados histológico e funcional semelhantes com células-tronco embrionárias espinhais humanas, comprovando a capacidade de diferenciação dessas células em neurônios¹⁷.

A despeito da relevância desses estudos, seus resultados divergem de estudos anteriores, que haviam relatado diferenciação e maturação limitada com o uso de precursores neurais expandidos *in vitro* e enxertados em medulas espinhais lesadas por trauma ou agentes químicos¹⁰. Outro ponto a ser considerado é a dificuldade de aproximação do modelo experimental adotado com a prática clínica, que passa desde a obtenção de células-tronco embrionárias e/ou pré-diferenciadas em linhagem neuronal, até ao enxerto das células diretamente no local de lesão isquêmica.

O uso inicial de células-tronco não embrionárias, tais como, células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, em lesões isquêmicas da medula espinhal, foi baseado no potencial dessas células em se diferenciar, *in vitro*, em neurônios e células gliais⁶⁹⁻⁷¹. Embora as células derivadas de medula óssea, a princípio, não sejam capazes de gerar um número apreciável de células

neurais *in vivo*, existem muitas evidências de melhora funcional após o transplante dessas células para a recuperação da medula espinhal lesada⁶⁶.

O uso de células-tronco, derivadas da medula óssea na lesão medular isquêmica, foi realizado em 2006 por Shi e colaboradores. Nesse estudo, coelhos submetidos ao clampeamento da aorta abdominal infra-renal e à injeção intratecal de células-tronco, dois dias antes, exibiram incorporação do enxerto e atenuação do déficit motor, comprovando a viabilidade do uso intratecal dessas células na lesão medular isquêmica¹⁶. O mesmo prognóstico foi obtido quando as células foram injetadas 30 minutos ou 24 horas após a oclusão aórtica¹⁸. Tal achado ressalta a importância de uma janela terapêutica apropriada para a terapia celular na lesão medular isquêmica.

Células do cordão umbilical humano na lesão da medula espinhal

Embora não tenha sido utilizada na lesão isquêmica da medula espinhal, o sangue do cordão umbilical consiste em fonte alternativa de células-tronco. Desde 1989, registrou-se a existência de células progenitoras com grande capacidade de proliferação e diferenciação em células neuronais e gliais *in vitro*. Células-tronco do cordão umbilical humano são capazes de repovoar a medula óssea⁷², compartilhando características semelhantes àquelas derivadas desse tecido. O fato de que tanto a hematopoiese quanto a neuropoiese possuem uma série de elementos comuns, reforça o uso dessas células no tratamento de desordens neurológicas^{73,74}.

Ao contrário de outros tipos celulares, células-tronco derivadas do cordão umbilical humano são facilmente disponíveis e desprovidas de questões éticas maiores; adicionalmente são células imaturas com alto poder de diferenciação e com relativa baixa imunogenicidade, o que torna seu uso atrativo, principalmente no tratamento de doenças da medula espinhal e em modelos experimentais²⁷.

Em modelos de lesão traumática, nos quais foram analisadas linhagens hematopoiéticas de células-tronco CD34⁺ do cordão umbilical humano, foi reportada a redução da área de lesão, aumento da área residual de substância branca e melhora na regeneração/preservação dos axônios, o que, provavelmente, leva à melhora clínica dos animais, visto que não houve evidência de diferenciação dessas células em linhagem neuronal^{28,30}.

Saporta e colaboradores, em modelo de compressão da medula espinhal, demonstraram que a infusão endovenosa de células-tronco do cordão umbilical humano melhora a função motora, reduz a área de cavitação cística e aumenta o volume residual da substância branca. Outro resultado importante desse estudo é que não houve evidência de reação imune à célula enxertada no local da lesão²⁹.

Publicação recente, em modelo de isquemia cerebral em ratos, revelou que a administração intratecal de células-tronco do cordão umbilical humano é factível e que um grande número de células enxertadas é capaz de migrar para as áreas de isquemia, atenuando a lesão cerebral. Adicionalmente, quando comparada à via endovenosa, a via intratecal se mostrou mais eficaz permitindo o uso de um número menor de células³¹.

Nenhum estudo, até o momento, investigou o uso de células-tronco do cordão umbilical humano, não fracionadas, em modelo de isquemia da medula espinhal em decorrência da oclusão da aorta torácica descendente em ratos.

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar os efeitos da injeção intratecal de células-tronco do cordão umbilical humano antes e após a indução de isquemia da medula espinhal por oclusão da aorta torácica descendente em ratos.

Objetivos Específicos

Avaliar a influência da terapia celular na reposta motora imediata e tardia e nas alterações histológicas do tecido da medula espinhal.

Avaliar a presença das células enxertadas no tecido medular.

MÉTODOS

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolado sob nº SDC 3248/08/164 (Anexo 1). Os animais utilizados foram obtidos junto ao Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e os experimentos conduzidos no laboratório de Cirurgia Cardiovascular e Fisiopatologia da Circulação (LIM-11), desta mesma faculdade. Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Cirurgia Experimental.

Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, machos, de aproximadamente dois meses de idade e pesando entre 350 e 450 g. Os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura (23 ± 2 °C), umidade e exposição à luz, com ciclo claro e escuro de 12 horas, e acesso livre à ração e água.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos, randomizados de acordo com o tempo e o tipo de tratamento (Figura 4).

Grupo controle-pré (Cpré): ratos que receberam infusão intratecal de HemoHes (6%) e albumina humana (20%) 30 minutos antes da indução da isquemia medular (n=10);

Grupo tratamento célula-pré (Tcpré): ratos que receberam infusão intratecal de suspensão de células-tronco em HemoHes (6%) e albumina humana (20%) 30 minutos antes da indução da isquemia medular (n=10);

Grupo controle-pós (Cpós): ratos que receberam infusão intratecal de HemoHes (6%) e albumina humana (20%) 30 minutos após a indução da isquemia medular (n=10);

Grupo tratamento célula-pós (Tcpós): ratos que receberam infusão intratecal de suspensão de células-tronco em HemoHes (6%) e albumina humana (20%) 30 minutos após a indução da isquemia medular (n=10).

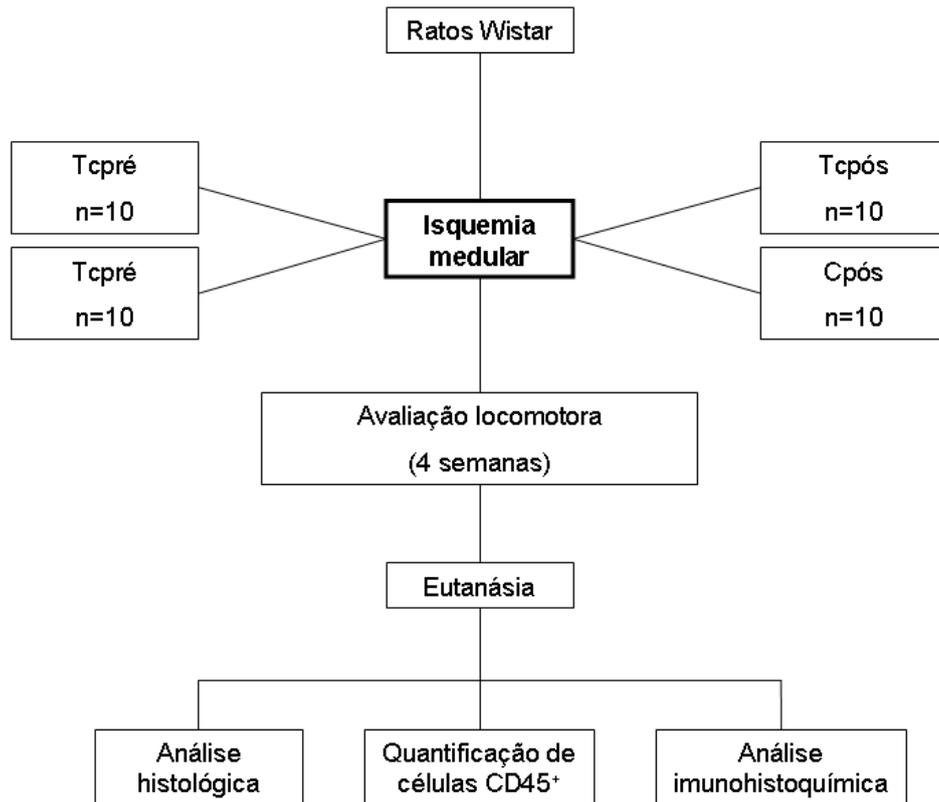


Figura 4. Protocolo experimental. Grupos: Cpré (n=10), Tcpré (n=10), Cpós (n=10), Tcpós (n=10).

Obtenção das células-tronco

O sangue de cordão umbilical e placentário humano (SCUP) foi obtido em regime de doação de parturientes da Associação Pró Matre do Rio de Janeiro, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão (Anexo 2). O procedimento de separação das células mononucleares de SCUP, fração que contém as células-tronco, e o congelamento das amostras foi realizado no laboratório da empresa Cryopraxis-RJ, conforme padronização técnica da empresa (Anexo 3).

O produto final do processamento foi avaliado por citometria de fluxo (*FACS - Fluorescent Activated Cell Sorting*) quanto aos marcadores de membrana CD45, CD34, CD133, KDR, CD144, CD45RA, CD146, CD166, CD10, CD38, CD24, CD1, CD3, CD4, CD8, CD38, CD122, CD56, CD66, CD41, CD14, CD16, CD19, a fim de identificar as populações celulares presentes nas amostras. Alíquotas, contendo concentrações de 1×10^8 células/mL desse *pool* de células-tronco, foram congeladas em agente crioprotetor DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) e armazenadas em nitrogênio líquido.

Anestesia e preparo cirúrgico

A anestesia foi induzida em câmara fechada com isoflurano a 5 %, seguida de intubação e ventilação mecânica através de ventilador para roedores (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA), sendo mantido o plano

anestésico com isoflurano a 2 %. A ventilação mecânica realizou-se com FiO_2 de 100 %, volume corrente de 10 mL/kg e 70 ciclos/min. Os animais foram colocados em decúbito dorsal em placa aquecida, para a manutenção da temperatura (37 °C) e passaram por tricotomia e antissepsia da região cervical ventral e da região de inserção da cauda ao abdômen, para posterior dissecação e cateterização da artéria carótida comum esquerda e arterial caudal.

Parâmetros hemodinâmicos e gasométricos

Através de um cateter de politetrafluoretileno (PE) 50, inserido em direção ao encéfalo na artéria carótida comum esquerda, acoplado a um transdutor de pressão (P23XL, Viggo-Spectramed Inc., Oxnard, CA, USA) conectado a um sistema multicanal de aquisição de dados biológicos (Acqknowledge – Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA), a pressão arterial proximal (PAP) foi continuamente registrada, de maneira indireta, durante todo o procedimento cirúrgico. Utilizando-se do mesmo sistema, na artéria caudal, foi inserido em direção ao abdômen um cateter PE 10 para o registro contínuo da pressão arterial distal de maneira direta (Figura 5). Amostras de sangue da artéria carótida comum esquerda (200 μL) foram coletadas para determinação dos parâmetros pH, pCO_2 , pO_2 , HCO_3^- e lactato (Radiometer ABL 555, Radiometer Medical, Copenhagen, Denmark).

Laminectomia e injeção intratecal

Após a dissecação e cateterização das artérias, os animais foram posicionados em decúbito ventral e uma incisão longitudinal mediana foi realizada na região lombar. A musculatura paravertebral foi dissecada entre L4 e L5 e procedeu-se a laminectomia e exposição da dura-máter, permitindo a inserção de um cateter PE10, previamente preenchido com a solução a ser infundida no espaço intratecal. Com auxílio de uma bomba de infusão, foram injetados 10 μ L de solução de Hemohees (6 %) e albumina humana (20 %) (grupos Cpré e Cpós) ou da suspensão contendo células-tronco (grupos Tcpré ou Tcpós) em 1 minuto.

Nos grupos pré-tratados (grupos Cpré ou Tcpré), os procedimentos para a realização da laminectomia e os tratamentos foram feitos 30 minutos antes da indução da isquemia. Nos grupos pós-tratados (grupos Cpós ou Tcpós), esses procedimentos foram realizados 30 minutos após a indução da isquemia.

Indução da isquemia medular

Após a inserção dos cateteres para o registro da pressão arterial, foram administrados 100 UI/kg de heparina, via arterial, para posterior indução da isquemia medular. Um cateter Fogarty[®] 2 F (Edwards Lifesciences LLC – Irvine, CA, EUA) foi inserido na artéria carótida comum esquerda até a aorta descendente (11 ± 1 cm no sentido caudal), seguido de insuflação parcial (40 μ L

de solução salina). O cateter, parcialmente insuflado, foi tracionado até o posicionamento correto do balão, no óstio da artéria carótida comum esquerda. Nessa posição consegue-se, também, a oclusão do óstio da artéria subclávia esquerda, importante via de circulação colateral. Com o cateter na posição correta, o balão foi completamente insuflado ($90\pm 10 \mu\text{L}$ de solução salina) mantendo a aorta ocluída por um período de 12 minutos.

Durante a oclusão da aorta, foi realizado o controle da PAP, mantendo os valores entre 50 e 60 mmHg através do aumento, quando necessário, da concentração do isoflurano inalado para 5 %, logo após a insuflação completa do balão (Figura 5).

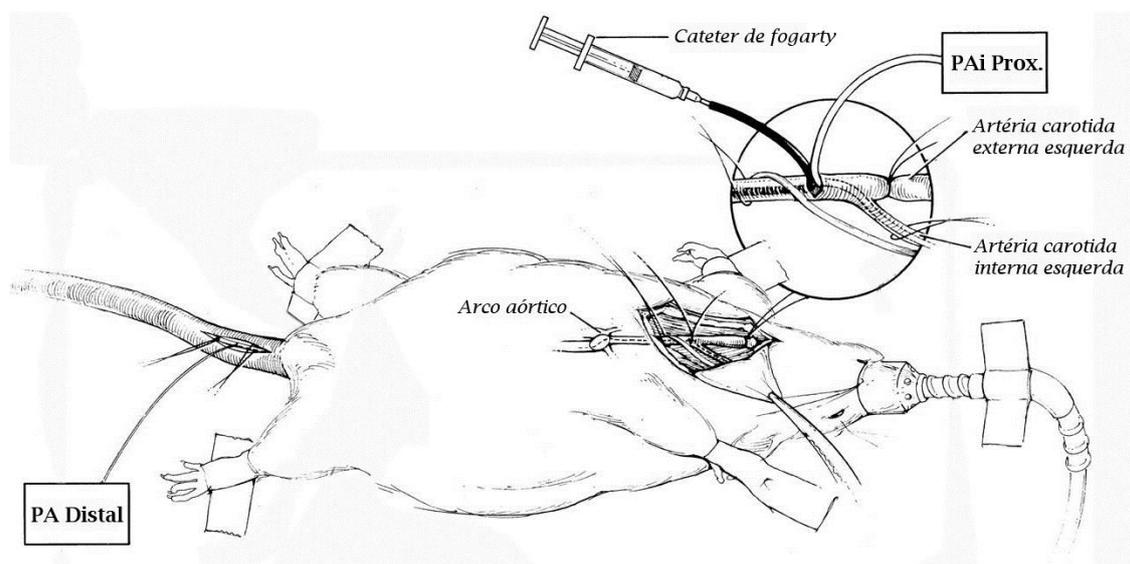


Figura 5. Representação esquemática do modelo cirúrgico adotado.

Preparo das amostras criopreservadas

As alíquotas, contendo células-tronco, foram descongeladas rapidamente em banho-maria (37 °C), suspensas em solução contendo 3 mL de albumina humana a 20 % (Sigma-Aldrich, Brasil) e 9 mL de HemoHes a 6 % (B.Braun, Brasil) e, posteriormente, centrifugadas a 500 xg, por 10 minutos a 4 °C. Após centrifugação, as células foram novamente suspensas em 1 mL da mesma solução, sendo a viabilidade celular determinada em câmara de Neubauer, através da coloração com azul de trypan (0,4 %). A suspensão final foi de 1×10^4 células em 10 μ L (Anexo 4).

Cuidados pós-operatórios e analgesia

Após o procedimento cirúrgico, a condição hemodinâmica foi monitorada através da manutenção da linha pressórica distal por 20 minutos. Nos primeiros 10 minutos de pós-operatório, foi obtida nova gasometria arterial para controle e, uma vez estabilizada a pressão arterial distal, a linha arterial foi retirada e o animal foi extubado. A analgesia de fase aguda foi realizada através da administração de dipirona (0,02 mg/kg via intraperitoneal), com manutenção por via oral (0,5 mL em 500 mL de água ofertada).

Avaliação da função locomotora

A avaliação da função locomotora dos animais foi realizada por dois pesquisadores independentes, cegos em relação ao tratamento, baseando-se na escala de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB), publicada em 1995⁷⁵, ao longo de quatro semanas. A avaliação foi realizada em uma área circular, com diâmetro de 100 cm e bordas laterais com 21 cm de altura. Os parâmetros analisados incluíram a variação de movimentos articulares dos membros inferiores (tornozelos, joelho e quadris), posição do abdômen, sustentação do corpo, posição das patas posteriores, equilíbrio, locomoção, coordenação de passo e posição da cauda, estabelecendo-se um escore que varia de 0 a 21, em que 0 representa a ausência total de movimentação e 21 significa movimentação, coordenação e equilíbrio normais. Os dados foram coletados em ficha própria para avaliação de acordo com tabela de classificação BBB (Anexos 5 e 6).

Eutanásia e coleta de material biológico

Após quatro semanas, os animais foram submetidos à anestesia com pentobarbital (50 mg/kg, via intraperitoneal) e a eutanásia realizada por decapitação. Com a abertura cervical do canal medular, resultante da decapitação, a medula espinhal foi retirada através da injeção de solução salina gelada na parte distal do canal. O material obtido foi, então, comparado à medida prévia da coluna vertebral, em cada animal, e seccionado o

segmento da transição toracolombar T2-L3 sendo, posteriormente, armazenado em nitrogênio líquido.

O material congelado foi fixado em solução tamponada de formaldeído, a 10 %, embebido em parafina, submetido a cortes histológicos com 4 μm de espessura e processados para análises histológica e imunohistoquímica.

Análise morfométrica dos neurônios viáveis e necróticos

A análise histológica foi realizada por patologista independente, cego com relação ao tratamento. Cortes histológicos de 4 μm de espessura da transição toracolombar (três cortes/animal) foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação do número de neurônios viáveis e necróticos presentes na substância cinzenta. Para leitura das lâminas, foi utilizado o software de análise de imagens NIS-Elements (Nikon, Tokyo, Japan)

A lesão isquêmica foi determinada pela presença de neurônios necróticos, caracterizados por citoplasma eosinofílico, núcleo condensado e diminuição do tamanho celular. Em contrapartida, os neurônios, considerados viáveis, apresentaram citoplasma mais claro, com pontilhados basofílicos (contendo substância de Nissl) e a presença de nucléolos. Em casos de lesão isquêmica mais severa, a substância branca, subjacente à área de lesão (substância cinzenta), também apresentava-se comprometida.

Em cada lâmina, foi contado o número de neurônios necróticos e viáveis em metade da substância cinzenta (corno anterior e posterior). O resultado da

variável morfométrica de cada animal foi expresso como média, permitindo a comparação entre os grupos em relação à porcentagem de neurônios viáveis e necróticos.

Imunohistoquímica para quantificação de células nervosas em processo de apoptose - TUNEL

Os cortes histológicos foram desparafinados por exposição repetida (três vezes) em xilol puro, seguido de exposição, a concentrações decrescentes de etanol (100 %, 95 % e 70 %), lavados em água corrente e imersos em solução tampão TRIS-HCl 10 mM, pH 7,4, contendo 20 µg/mL de proteinase K (Invitrogen) durante 30 minutos, a 37 °C, seguido de lavagem com tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4).

As amostras foram, então, recobertas com 10 µL da solução para TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit-POD*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) por 90 minutos a 40 °C. A partir da adição da solução de TUNEL, todo o restante do protocolo foi realizado ao abrigo da luz. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS (três vezes), por cinco minutos, e as amostras tratadas com o reagente *ProLong® Antifade Kit* (Invitrogen) para preservar a fluorescência.

Imunohistoquímica para a detecção e quantificação de células humanas hematopoiéticas CD45⁺ na medula espinhal

Cortes histológicos (4 µm de espessura) foram desparafinados e reidratados, conforme descrito acima, para posterior quantificação de células humanas hematopoiéticas CD45⁺. Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados com kit *CSAII Biotin-free tyramide signal amplification system* (Dako USA), seguindo as especificações do fabricante. Ao final da reação, os cortes foram lavados com água e contracolorados com hematoxilina, seguido de desidratação em etanol, diafanização em xilol e recobertos com *Permount Resin* (Fischer SP15). A determinação da sobrevida do enxerto foi realizada de maneira semiquantitativa, através da análise de campos selecionados aleatoriamente, avaliados por um examinador cego, com relação ao grupo da amostra. Para cada campo analisado, foi determinado o número de células marcadas positivamente na substância cinzenta. Todas as imagens foram analisadas através do software NIS-Elements (Nikon, Tokyo, Japan).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Graphpad Prism 5.2. As variáveis paramétricas foram expressas como média±erro padrão da média (EPM) e analisadas através dos testes de análise de variância de duplo fator, complementados pelo teste *t* de Bonferroni. As

variáveis não paramétricas foram expressas em medianas e percentis, e foram analisadas através do teste de Kruskal Wallis, complementado pelo teste de Dunn. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Resultados

RESULTADOS

A taxa de mortalidade global observada foi de 30 %, sendo registrados quatro óbitos no grupo Tcpré, três no grupo Cpré, dois no grupo Tcpós e três no grupo Cpós., Os 28 animais que sobreviveram ao período imediato (vinte e quatro horas) foram considerados para o estudo e compuseram a amostra assim distribuída: Tcpré n=6, Cpré n=7, Tcpós n=8 e Cpós n=7. De acordo com os critérios de sofrimento animal estabelecidos (Anexo 7), quatro animais foram submetidos à eutanásia antes do término do período de 28 dias: Tcpré, dois animais (dia cinco e seis)); Cpré, um animal (dia três); Tcpós, um animal (dia três).

Amostras de sangue arterial foram coletadas antes da insuflação do cateter para a determinação dos valores basais de pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3^- e lactato. Após 12 minutos de indução da isquemia foram observadas alterações previsíveis nos parâmetros gasométricos, em especial, redução nos níveis de HCO_3^- e aumento de lactato, não havendo diferença entre os grupos (Anexo 8).

Após a inserção e insuflação do cateter Fogarty[®], todos os animais apresentaram queda nos valores de pressão arterial média distal, não havendo diferença entre os grupos (Tabela 1). A pressão arterial média proximal se manteve estável durante o período de clampeamento e, novamente, não diferiu entre os grupos durante todo tempo de aferição (Tabela 2).

Tabela 1. Valores de pressão arterial média (PAM) distal dos grupos durante os procedimentos experimentais

	PAM Distal (mmHg)			
	Cpré	Tcpré	Cpós	Tcpós
0 min	89,6 ± 10,9	83,4 ± 11,7	100,3 ± 16,4	101,5 ± 11,4
4 min	9,5 ± 2,0	12,9 ± 2,6	11,5 ± 2,3	12,1 ± 1,5
8 min	8,3 ± 1,3	11,3 ± 3,0	9,7 ± 2,4	10,1 ± 2,8
12 min	8,1 ± 1,7	10,5 ± 3,5	9,2 ± 2,2	9,8 ± 2,8

Valores representam média±EPM de 10 animais/grupo.

Tabela 2. Valores de pressão arterial média (PAM) proximal dos grupos durante os procedimentos experimentais

	PAM Proximal (mmHg)			
	Cpré	Tcpré	Cpós	Tcpós
0 min	54,7 ± 12,9	66,1 ± 33,4	56,8 ± 10,3	55,5 ± 9,6
4 min	47,0 ± 8,2	58,8 ± 11,1	52,4 ± 12,2	58,6 ± 6,6
8 min	47,0 ± 5,8	51,0 ± 9,5	46,3 ± 8,7	53,7 ± 4,7
12 min	49,7 ± 11,1	50,8 ± 8,3	47,1 ± 6,7	55,9 ± 6,4

Valores representam média±EPM de 10 animais/grupo.

Avaliação da função motora

No primeiro dia de avaliação, após a conclusão dos procedimentos cirúrgicos, houve comprometimento importante da função locomotora, semelhante nos quatro grupos estudados, em 64 % dos animais (n=18). Nos grupos Tcpré, Cpré e Cpós, manteve-se o mesmo nível de comprometimento da função locomotora ao longo de todo o período avaliado. Ao contrário, o grupo Tcpós apresentou melhora progressiva da função locomotora tornando-se significativa, em relação ao primeiro dia de segmento, a partir do 14º dia pós-operatório ($p=0,0006$). Não houve diferença significativa, do ponto de vista

estatístico, quando os quatro grupos foram comparados entre si ($p=0,8351$). (Figura 6).

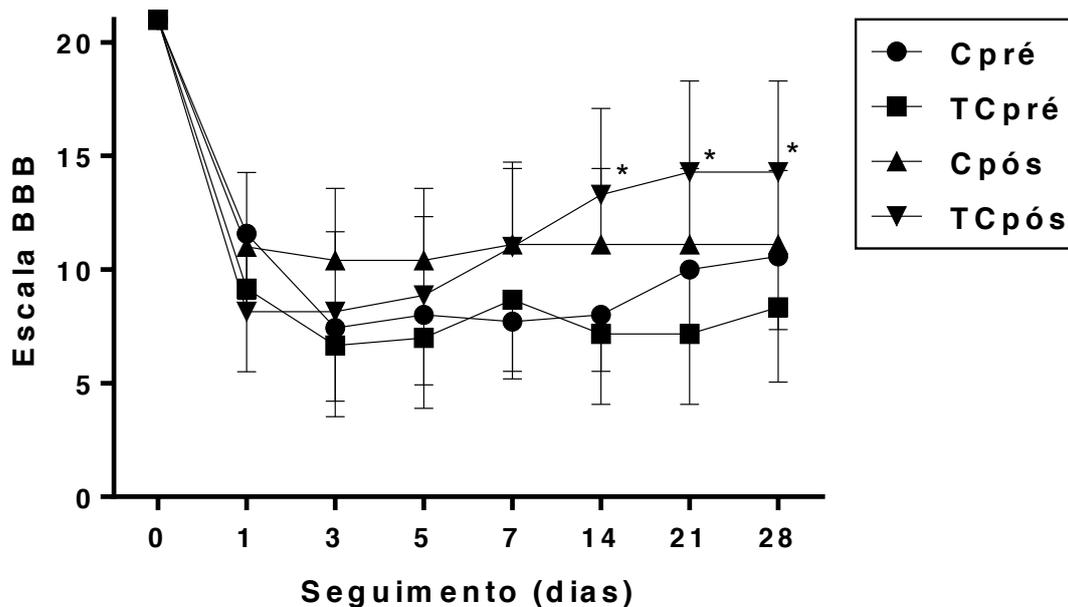


Figura 6. Avaliação da função locomotora através da escala BBB até 28 dias após a indução de isquemia medular. Tcpré (n=6); Cpré (n=7); Tcpos (n=8); Cpos (n=7). * $p<0,05$ em relação ao primeiro dia de seguimento.

Avaliação morfométrica dos neurônios viáveis e necróticos

A análise morfométrica da viabilidade neuronal indicou que menos da metade dos neurônios encontravam-se na sua forma viável, tanto no corno anterior quanto no corno posterior da medula (Figura 7). Os animais do grupo Tcpos apresentaram porcentagem de neurônios viáveis superior aos demais grupos, embora sem diferenças estatísticas significativas (Figura 7).

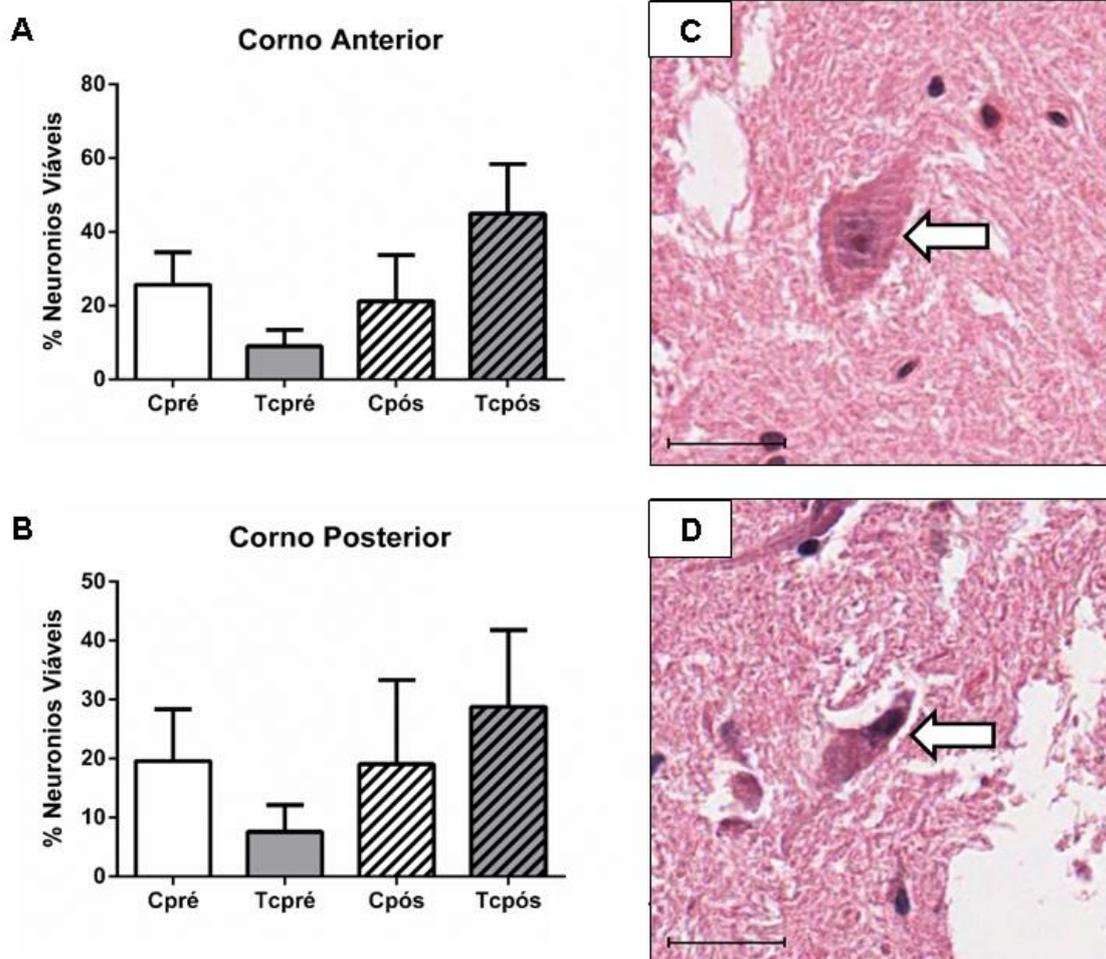


Figura 7. Determinação da porcentagem de neurônios viáveis na medula de ratos submetidos à isquemia medular. A, corno anterior; B, corno posterior. Valores representam a média \pm EPM. Fotomicrografias representativas da avaliação histológica: C, Neurônio viável; D, Neurônio necrótico.

Avaliação imunohistoquímica para quantificação de células nervosas em processo de apoptose

Através da técnica do TUNEL, foi possível observar que a lesão isquêmica resultou em poucas células apoptóticas ao final de 28 dias, conforme ilustrado na Figura 8. Nessa avaliação, houve diferença significativa entre os

grupos ($p=0,048$), sendo observado que os animais do grupo Tcpós apresentaram menor número de células apoptóticas (Figura 8).

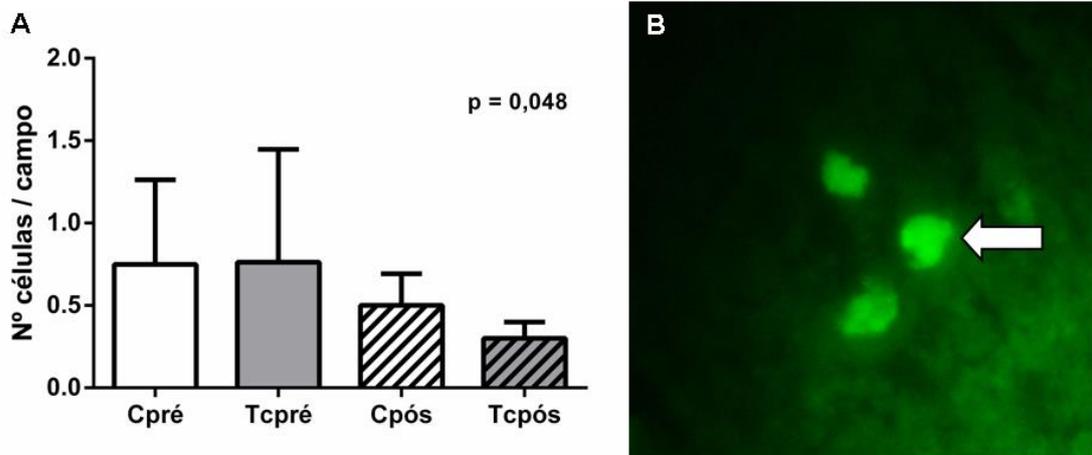


Figura 8. A, avaliação do processo apoptótico através do método de TUNEL. Valores representam média \pm EPM. B, fotomicrografia representativa de células TUNEL⁺. Aumento x1.000.

Avaliação imunohistoquímica para a detecção e quantificação de células humanas hematopoiéticas CD45⁺ na medula espinhal

Na avaliação da sobrevivência e incorporação do enxerto, observou-se a presença de células-tronco humanas CD45⁺ apenas nos animais dos grupos tratados. A presença dessas células foi similar nos dois grupos, não sendo observada diferença significativa com relação ao momento do tratamento (Figura 9).

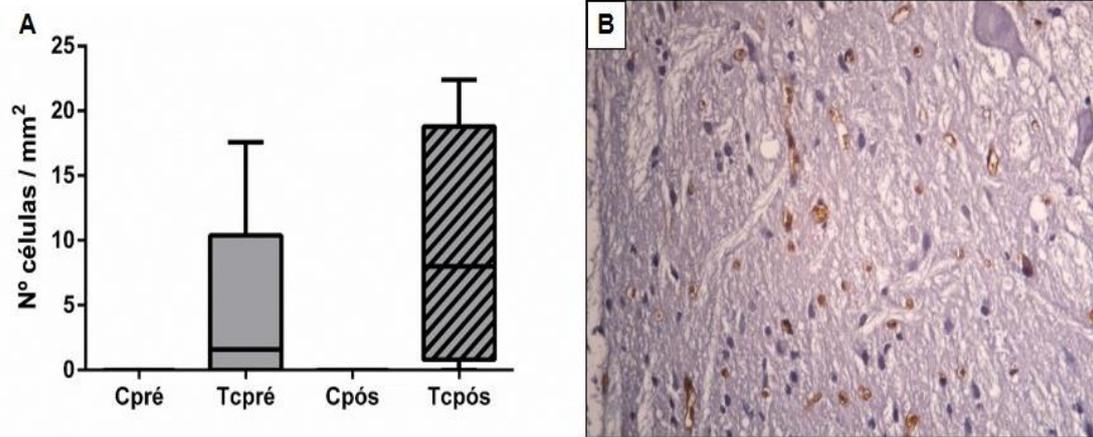


Figura 9. A, avaliação do implante de células-tronco através da quantificação de células CD45⁺ por imunohistoquímica. Valores representam média \pm EPM. B, fotomicrografia representativa de células CD45⁺.

Discussão

DISCUSSÃO

Embora não se conheça o exato mecanismo de atuação dos diferentes tipos de células-tronco na lesão neurológica isquêmica, diversas evidências apoiam o uso dessas células no intuito de restabelecer os circuitos neuronais lesados e/ou potencializar a liberação de fatores tróficos locais.

Diversos autores já demonstraram a capacidade das células-tronco, derivadas do sangue do cordão umbilical humano, de se incorporar ao tecido nervoso e expressar marcadores neurais nas áreas de lesão medular traumática^{28,29}. A diferenciação em células com fenótipo neuronal foi igualmente demonstrada nas lesões cerebrais isquêmicas²¹. Contudo, nenhum estudo abordou o comportamento dessas células na lesão isquêmica da medula espinhal.

Os resultados do presente estudo demonstram que células-tronco do cordão umbilical humano, injetadas por via intratecal 30 minutos após a oclusão da aorta torácica descendente, em modelo de isquemia da medula espinhal em ratos, são capazes de se incorporar nas áreas de lesão isquêmica, sobreviver nesse ambiente por, pelo menos, quatro semanas e, ainda, proporcionar algum grau de melhora do déficit neurológico.

Estudos, utilizando células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e injetadas por via intratecal, dois dias antes da lesão medular isquêmica, já haviam demonstrado a capacidade de atenuar o déficit neurológico em coelhos¹⁶. O mesmo resultado foi alcançado quando essas

células foram injetadas duas ou 24 horas após a oclusão da aorta, mas não após 48 horas, ressaltando a importância da janela terapêutica na terapia com células-tronco, no que se refere à lesão isquêmica da medula espinhal¹⁸. Em ambos os estudos, utilizou-se o modelo de clameamento aórtico infrarenal, o qual pode não representar o que, efetivamente, ocorre nas situações de correção das doenças da aorta torácica descendente⁵⁹.

O mecanismo que leva à degeneração neuronal, induzida pela isquemia, é apenas parcialmente compreendido. Em contraste com os achados histopatológicos encontrados em animais com paraplegia isquêmica espástica, aqueles com apresentação flácida da doença demonstram alterações neurodegenerativas pan-necróticas, afetando tanto neurônios inibitórios quanto excitatórios, bem como motoneurônios ventrais³⁹. A atuação das células-tronco, dentro desse largo espectro de disfunção do tecido nervoso, corrobora a existência de diversos mecanismos associados à atenuação da lesão medular isquêmica.

Em modelo de paraplegia espástica em ratos, Ciskova e colaboradores demonstraram uma progressiva recuperação da função motora após a injeção de células-tronco embrionárias humanas, pré-diferenciadas em linhagem neuronal, diretamente na medula espinhal. Adicionalmente, correlacionaram tal melhora com a sobrevivência e a diferenciação das células-tronco em neurônios com fenótipo GABAérgico¹⁷.

Embora as células-tronco, pré-diferenciadas em linhagem neuronal, tenham maior capacidade de se diferenciarem em neurônios e células gliais *in vivo* do que as células-tronco derivadas do cordão umbilical⁶⁹, faz-se

necessário ressaltar a dificuldade de obtenção dessas células para o uso clínico imediato.

Por outro lado, tanto as células-tronco derivadas da medula óssea, quanto aquelas provenientes do cordão umbilical humano, demonstram outras propriedades funcionais além da diferenciação celular. Entre essas propriedades, destacam-se os efeitos neuroprotetores, neovascularização e indução de novos axônios^{23,76,77}.

Em nosso estudo, a maioria dos animais apresentou paraplegia flácida. Nessa situação, as células-tronco do cordão umbilical humano, identificadas por um marcador específico de linhagem hematopoiética humana CD45⁺, não apresentaram características de astrócitos ou células neuronais. No entanto, mesmo na ausência de diferenciação nesses fenótipos, a interação dessas células com o tecido hospedeiro, através da liberação de fatores tróficos, pode ser suficiente para exercer um efeito reparador e permitir a recuperação funcional dos animais²³.

A melhora precoce da função motora, observada nos animais que receberam células-tronco após a indução da isquemia, parece ser resultado de efeitos neurotróficos, capazes de modular a resposta inflamatória e conferir neuroproteção. Outro fator que corrobora essa hipótese é que parece improvável que a presença de poucas dessas células, no local da lesão, seja suficiente para restabelecer a função neurológica através da substituição dos neurônios lesados. Adicionalmente, não houve correlação entre o número de células encontradas e a melhora da função motora dos animais.

O modelo experimental utilizado é factível, embora haja, ainda, uma preocupação em relação à mortalidade dos animais, principalmente devido à isquemia visceral. Isso se deve ao fato de que não apenas a medula espinhal, mas também, fígado, intestinos e rins tiveram seu aporte sanguíneo drasticamente reduzido durante o período de oclusão da aorta. Não obstante a oclusão da aorta torácica descendente contribuir com a morbi-mortalidade dos animais, esse modelo é fidedigno e representa a prática cirúrgica adotada no tratamento de doenças da aorta torácica descendente⁵⁹.

O desenvolvimento de um método efetivo de administração das células-tronco é premente, uma vez que a segurança e a eficácia da terapia celular dependem do modo de administração. Ensaios com injeções endovenosas de células derivadas da medula óssea, em roedores, foram reportados como sendo comparativamente menos invasivos e mais bem tolerados³¹, porém, com o uso dessa via, muitas células podem ser amplamente distribuídas por todo o organismo, principalmente para fígado, baço e rins. Outra questão relevante é a da reprodutibilidade do seu uso para enxerto de células no sistema nervoso central, na ausência de interrupção da barreira hemato-encefálica⁷⁸. Os dados do presente estudo corroboram a eficácia da via intratecal para injeção de células-tronco do cordão umbilical humano. Esse método se mostrou viável e seguro para a administração dessas células nesse tipo de lesão, permitindo múltiplas injeções, o que pode ser útil na determinação do tempo de janela terapêutica.

Em relação ao momento da administração, a evidência, tanto de necrose quanto de apoptose foi maior, aparentemente, em segmentos toracolombares

dos grupos controle e no grupo que recebeu células-tronco antes da isquemia. Ao contrário, os animais, que foram tratados após 30 minutos da lesão, exibiram uma melhor evolução motora e menor nível de apoptose ao final de quatro semanas. É possível que essas células, introduzidas imediatamente antes da isquemia, não apenas não sobrevivam a esse processo (caracterizado principalmente por componentes tóxicos como radicais de oxigênio e enzimas líticas), mas possam ainda piorar a resposta inflamatória.

Nosso estudo corrobora o uso de células-tronco na lesão isquêmica da medula espinhal, representando um passo importante no tratamento da isquemia medular decorrente das cirurgias que envolvem as doenças da aorta torácica descendente. Por outro lado, há a necessidade de estudos adicionais para a investigação dos mecanismos envolvidos com a atuação das células-tronco, o tempo ideal de janela terapêutica e o número adequado de células a serem administradas na lesão medular isquêmica.

Conclusões

CONCLUSÕES

- A injeção intratecal de células-tronco do cordão umbilical humano é factível e foi capaz de melhorar o déficite motor em ratos, quando realizada 30 minutos após a isquemia da medula espinhal;
- As alterações histológicas da medula espinhal, particularmente no corno anterior, caracterizadas por maior número de neurônios viáveis e menor incidência de apoptose, não se correlacionaram significativamente com o comportamento funcional dos grupos estudados;
- As células do cordão umbilical humano foram capazes de se incorporarem e sobreviverem na medula espinhal por até 28 dias de seguimento.

ANEXOS

Anexo 1.



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15/04/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0281/09**, intitulado: "**EFEITO DA INJEÇÃO INTRATECAL DE CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO APÓS LESÃO ISQUÊMICA DA MEDULA ESPINHAL EM RATOS**" apresentado pelo Departamento de **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Luiz Felipe Pinho Moreira**

Pesquisador (a) Executante: **Gustavo Leno Judas**

CAPPesq, 15 de Abril de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
17/04/09
Esaine

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnnet.usp.br

Anexo 2.

Seleção das pacientes que farão a doação de SCUP

Critérios de inclusão:

- Gestantes com idade entre 18 e 36 anos, 11 meses e 29 dias;
- Idade gestacional de no mínimo 35 semanas;
- Gestantes que concordaram e assinaram o TCLE.

Critérios de exclusão:

- Sofrimento fetal grave;
- Feto com anormalidade congênita;
- Infecção durante o trabalho de parto;
- Temperatura materna superior a 38 °C durante o trabalho de parto;
- Gestante com situação de risco acrescido para transmissão de doença infecciosa transmissível pelo sangue (HIV, CMV, HTLV, Toxoplasmose, Hepatites B e C);
- Presença de doenças que possam interferir com a vitalidade placentária;
- Gestante em uso de hormônios ou drogas que se depositam nos tecidos;
- Gestante com história pessoal de doença sistêmica auto-imune ou de neoplasia;
- Gestante e seus familiares, pais biológicos e seus familiares, ou irmãos biológicos do recém-nascido com história de doenças hereditárias do sistema hematopoético (doença falciforme, talassemia, deficiências enzimáticas, esferocitose, eliptocitose, anemia de Fanconi, porfiria, plaquetopatias, neutropenia crônica, outras doenças de neutrófilos), doença granulomatosa crônica, imunodeficiência, demência, doenças neurológicas degenerativas, doenças metabólicas ou outras doenças genéticas.

Anexo 3.

Coleta de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (SCUP)

A coleta de SCUP será realizada antes e após a dequitação da placenta (intra e extra-útero) de acordo com procedimento padronizado e validado pela Cryopraxis. Após o nascimento do bebê, a porção mais distal do cordão umbilical deverá ser puncionada com agulha estéril ligada a uma das vias da bolsa de coleta (contém citrato de sódio como anticoagulante). Após a dequitação espontânea da placenta, esta deverá ser colocada sobre campo estéril e o cordão umbilical puncionado com a agulha da outra via ligada a bolsa de coleta. A punção deve ocorrer o mais próximo possível da placenta e deve-se coletar o maior volume possível de sangue. A bolsa contendo o SCUP deve ser acondicionada em frascueira térmica adequada e enviada ao laboratório de processamento.

Análises do material coletado e do sangue materno

Microbiologia

O sangue de cordão umbilical coletado será testado quanto a presença de microorganismos aeróbios e anaeróbios em frascos de hemocultura que serão avaliados pelo laboratório prestador de serviços da Cryopraxis. As amostras que apresentarem microbiologia positiva serão descartadas.

Sorologia

Deverá ser coletada uma amostra de sangue materno e as sorologias para HIV (Vírus da imunodeficiência humana), HTLV (vírus linfotrópico humano para células T), CMV (Citomegalovírus) IgM e IgG, Toxoplasmose IgM e IgG, Hepatite B e C testadas de acordo com o descrito na Resolução - RDC 153/04 - ANVISA. As amostras serão descartadas caso alguma dessas sorologias seja reagente; exceto quando CMV e/ou Toxoplasmose IgG.

Processamento de SCUP

Os procedimentos de separação das células mononucleares de SCUP (fração que contém as células-tronco) serão realizados no laboratório matriz da Cryopraxis no Rio de Janeiro.

O material coletado será submetido à separação da fração de células mononucleares por gradiente de densidade. Todo o sangue coletado será processado e o número total de células obtido quantificado em contador automático. A presença de contaminação microbiológica será detectada à partir

de hemocultura aeróbia e anaeróbia; afim de garantir a qualidade da amostra que será infundida.

O produto final do processamento será fracionado em aliquotas contendo 108 células. A solução de células receberá a adição de agente crioprotetor (DMSO – dimetilsulfóxido). Esta solução contendo o agente crioprotetor será acondicionada em criotubos e submetida a congelamento programado em equipamento automático; onde a temperatura será reduzida gradativamente para evitar danos às células. Os criotubos contendo a solução celular serão armazenados em tanques de nitrogênio líquido.

Análises do material processado

Leucometria diferencial

O SCUP coletado e as células mononucleares separadas deverão ser avaliados em contador automático de células para determinação das populações celulares presentes na amostra (leucócitos totais, linfócitos, monócitos e granulócitos).

Viabilidade celular

A viabilidade das células mononucleares após separação será quantificada pelo método de Azul de Trypan (0,4%).

Marcadores de membrana

As células mononucleares serão avaliadas por FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) quanto aos marcadores de membrana CD45, CD34, CD133, KDR, CD144, CD45RA, CD146, CD166, CD10, CD38, CD24, CD1, CD3, CD4, CD8, CD38, CD122, CD56, CD66, CD41, CD41, CD14, CD16, CD19 a fim de identificar e quantificar as populações celulares presentes nas amostras a serem infundidas.

Microbiologia

O produto final (amostra após processamento) será testado quanto a presença de microorganismos aeróbios e anaeróbios em frascos de hemocultura que serão avaliados pelo laboratório prestador de serviços da Cryopraxis. As amostras que apresentarem microbiologia positiva serão descartadas.

Transporte das células de SCUP criopreservado

As amostras criopreservadas deverão ser enviadas pelo laboratório da Cryopraxis-RJ para o laboratório onde ocorrerá a infusão no Laboratório de Investigação Médica-11 (LIM-11) em contêiner tipo dry shipper específico para o transporte de amostras criopreservadas de acordo com o protocolo de envio de amostras criopreservadas, seguindo procedimento validado pela Cryopraxis. O centro de infusão deverá fazer solicitação das amostras, descrevendo o número de alíquotas, com pelo menos 48 horas de antecedência a data de infusão. Todas as alíquotas serão enviadas e armazenadas no centro de infusão no Laboratório de Investigação Médica-11 da Faculdade de Medicina da universidade de São Paulo.

Anexo 4.

Material necessário para o descongelamento

2 Tubos Falcon de 15 ml
 2 eppendorf de 2ml
 Corante azul de trypan
 Acido acético 2%
 Albumina humana 20%
 HemoHes 6%
 1 pipeta de 1000- ponteira
 1 pipeta de 100- ponteira
 Pota de descarte
 Estante para tubos
 1-Par de luvas
 2-Seringas de 10ml
 2-Seringas de 3ml
 2- agulhas de 30X0,7

Com exceção do HemoHes e da Albumina todos os materiais devem ser esterilizados antes do procedimento no fluxo laminar com a luz UV durante 30 min

Protocolo de descongelamento da amostra

1º. No 1º tubo Falcon preparar a solução HemoHes /Albumina 5% ou solução Dextran 40/Albumina 5% em uma diluição de 1:4.

Albumina humana 20%.....3ml
 HemoHes 6%.....9ml
 Preparando uma solução total de 12 ml

2º. Retirar do 1º tubo 2ml da solução HemoHes/Albumina e transferir para o 2º tubo.
 3º. Adicionar 1ml da amostra ao tubo com 10 ml e homogenizar bem.

4º. Centrifugar o material à 1200 rpm por 10' a 4°C.

5º. Descartar o sobrenadante e ressusender o pellet (suspensão de células) em 1 ml da solução H/A homogenizando com a ajuda da pipeta.

6º. Em um eppendorf adicionar 20µL da suspensão de células, 20µL de azul de trypan e 760 µL de ácido acético homogenizar bem.

7º. Com o auxílio da pipeta transferir uma alíquota para câmara de Neubauer e fazer a contagem celular

Cálculo de Viabilidade Celular

-Contar os 4 quadrantes e utilizar a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular \%} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células vivas} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ células totais}}$$

Células vivas: Células transparentes

Células mortas: Células de cor azul

Células totais: vivas e mortas

Anexo 5.

Anexo A - Ficha de pontuação com os atributos que acompanham a escala de avaliação locomotora de BBB

Rat#: _____ Data: _____ DPO: _____ Escore: E ____ D ____

Movimento do membro						Posição do Tronco		Abdomen	Posição da Pata			Passo				Coordination	Limpar Patas	Posição Predominante da pata				Instabilidade do Tronco	Rabo			
Quadril		Joelho		Tornoz.		Lado	Prop		Varrer	Plantar PL.		Dorsal		Plantar				contato Inicial	Elevar	E D	E D					
E	D	E	D	E	D					E	D	w/o Sup.	w. Sup.	E	D									E	D	E
Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	E	D	E	D	Arrasto	E	D	E	D	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	I	I	I	I		Acima
S	S	S	S	S	S			Paralelo					0	0	0	0	0	0	0	0	E	E	E	E		
E	E	E	E	E	E			Alto					F	F	F	F	F	F	F	F	P	P	P	P		Baixo

E = esquerdo D = direito Tornoz = tornozelo

Comment: _____

- Ø - Sem movimento
- S - Movimento leve
- E - Movimento extenso

- Ø - Nada 0%
- 0 - Ocasional <50%
- F - Frequente 51 - 94%
- C - Consistente 95-100%
- I - Rotação interna
- E - Rotação Externa
- P - Paralela

FONTE: BASSO et al. (1995)

Anexo 6.

Anexo B - Escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB)

0	Sem movimentos observáveis na pata traseira (PT)
1	Leve movimento de uma das duas articulações, usualmente o quadril e/ou o joelho
2	Extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e um leve movimento de outra
3	Extenso movimento de duas articulações
4	Leve movimento de todas as três articulações da PT
5	Leve movimento de duas articulações e extenso movimento da terceira
6	Extenso movimento de duas articulações e leve da terceira
7	Extenso movimento de todas as três articulações da PT
8	Arrastar ou acomodação plantar da PT sem suporte de peso
9	Acomodação plantar da PT com suporte de peso somente quando imóvel ou ocasional. Freqüente ou consistente apoio dorsal e sem apoio plantar da pata
10	Ocasional suporte de peso plantar, sem coordenação PT-PD
11	Frequente a consistente suporte de peso plantar e sem coordenação PT-PD
12	Frequente a consistente suporte de peso plantar e ocasional coordenação PT-PD
13	Frequente a consistente suporte de peso plantar e freqüente coordenação PT-PD
14	Suporte de peso plantar consistente, consistente coordenação PT-PD, posição predominante da pata durante a locomoção em rotação (interna ou externa), quando realizado contato inicial no solo quando solto, ou freqüente suporte plantar, consistente coordenação PT-PD e ocasionais passadas dorsais
15	Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD e sem limpeza dos pés ou ocasional limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo
16	Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e freqüente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo e rodada ao se levantar
17	Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e freqüente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar
18	Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata ao contato inicial é paralela ao corpo e rodada ao se levantar
19	Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés durante a ascensão adiante do membro, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar e o rabo está para baixo parte ou todo o tempo
20	Consistentes passadas plantares e consistente coordenação PT-PD durante a marcha e consistente limpeza dos pés, posição predominante da pata é paralela ao corpo ao contato inicial e ao se levantar, e instabilidade do tronco; o rabo está para cima consistentemente
21	Consistentes passadas plantares e coordenação de marcha, consistente limpeza dos pés. Posição predominante da pata é paralela por todo o instante, e consistente estabilidade do tronco; rabo consistentemente elevado

Nota. Leve: movimento parcial menor que a metade da amplitude normal. **Extensivo:** movimento maior que a metade da amplitude. **Varrer:** movimentos rítmicos de extensão para flexão completa e novamente extensão da PT. **Sem suporte de peso:** sem contração dos músculos extensores da PT durante a acomodação plantar da pata ou sem elevação do quarto traseiro. **Suporte de peso:** presença de contração dos músculos extensores da PT durante a acomodação plantar da pata ou elevação do quarto traseiro. **Apoio plantar:** pata em contato plantar com suporte de peso. **Apoio dorsal:** peso suportado pela superfície dorsal em alguns pontos do ciclo da marcha. **Coordenação PT-PD:** para cada passo da pata dianteira um passo da pata traseira é dado. **Ocasional:** menor ou igual a 50%. **Frequente:** maior que a metade, mas não sempre (51-94%). **Consistente:** quase sempre ou sempre (95-100%). **Instabilidade de tronco:** deslocamento lateral do peso que cause balançar de latero-lateral ou colapso parcial do tronco.

FONTE: BASSO et al. (1995)

Anexo 7.

TABLE 4. ANIMAL MONITORING CRITERIA

	Score 0	2	5	10	15	20
Body weight	0-4% weight loss	5-9% weight loss	10-14% weight loss		15-19% weight loss (IT)	20% weight loss (IE)
Physical appearance	Normal		General lack of grooming or alopecia	Dermatitis or minor porphyrin or ocular/ nasal discharge	Piloerection, hunched up or severe porphyrin (IT)	Hunched and eyes half closed (IE)
Behavior/activity	Normal mobility above and contralateral to injury		Less mobile, but social and alert	Less mobile and isolated, but alert	Less mobile and very still, not alert (IT)	No response when stimulated (IE)
Clinical signs	None		Soft stools or blood in the urine	Shallow or increased respiratory effort	Severe diarrhea or skin tenting (1 sec) (IT)	Irregular gasping respirations or pale skin; seizures or temperature $\pm 3^{\circ}\text{C}$ of normal (IE)
Lesions/autotomy	No lesions	Redness or scab on wound		Open or weeping surgical wound (IT or ISA); open lesion; (self-mutilating) (ISA)	Digit autotomy beyond second knuckle on <2 digits (IT)	Autotomy of the metatarsals, digit autotomy beyond second knuckle on >2 digits or reopening of lesion (IE)
Tumors/cysts	None		Small subcutaneous tumor or cyst		Tumor or cyst with small scab; large tumor or cyst	Large tumor or cyst affecting mobility (IE)

The animals are assessed and scored in six categories to generate a composite score. Experimental animals are weighed and monitored daily. In addition to a number of well-defined humane end-points, a composite score of 20 or above necessitates euthanasia. Using our monitoring system, scores for animals with T3 complete transection SCI and sham injury are generally similar by 14 days post-surgery.

IT, immediate treatment required; ISA, immediate surgical attention required; IE, immediate euthanasia.

Anexo 8.

Tabela com avaliação gasométrica antes e após a indução da isquemia medular

	Gasometria pré isquemia				Gasometria pós isquemia			
	Cpré	Tcpré	Cpós	Tcpós	Cpré	Tcpré	Cpós	Tcpós
pO ₂	362,9 ± 111,4	334,7 ± 39,2	290,4 ± 79,5	328,4 ± 77,8	365,1 ± 139,1	249,7 ± 127,7	344,2 ± 105,2	304,4 ± 81,2
pCO ₂	22,2 ± 6,2	20,1 ± 5,8	20,1 ± 3,9	18,6 ± 2,6	22,2 ± 5,4	12,6 ± 2,4	21,9 ± 9,3	19,5 ± 3,9
Lactato	2,7 ± 0,9	3,4 ± 1,0	3,1 ± 0,5	3,1 ± 1,3	5,9 ± 2,1	7,0 ± 1,4	5,8 ± 1,7	6,6 ± 1,6
pH	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,0	7,6 ± 0,0	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1
HCO ₃	18,1 ± 3,2	19,0 ± 5,3	19,0 ± 3,5	18,0 ± 2,6	14,0 ± 1,9	12,6 ± 2,4	14,4 ± 4,0	13,0 ± 1,3

Valores representam média±EPM de 10 animais/grupo. Cpré, animais tratados com veículo antes da indução da isquemia medular; Tcpré, animais tratados com células tronco previamente à indução da isquemia medular; Cpós, animais tratados com solução veículo após a indução da isquemia medular; Tcpós, animais tratados com células tronco após a indução da isquemia medular.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Coselli JS, LeMaire SA, Miller CC III, et al. Mortality and paraplegia after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: a risk factor analysis. *Ann thorac Surg.* 2000;69:409-14.
2. Safi HJ, Miller CC III, Huynh TT, Estrera AL, Porat EE, Winnerkvist AN, Allen BS, Hassoun HT, Moore FA. Distal aortic perfusion and cerebrospinal fluid drainage for thoracoabdominal and descending thoracic aortic repair: ten years of organ protection. *Ann Surg.* 2003;238:372-80.
3. Svenson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ. Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. *J Vasc Surg.* 1993;17:357-61.
4. Stolf NAG, Benício A, Judas GI, et al. Intramural hematoma of the ascending aorta. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(6):e236-38.
5. Reier PJ, Anderson DK, Thompson FJ, Stokes BT. Neural tissue transplantation and CNS trauma: anatomical and functional repair of the injured spinal cord. *J Neurotrauma.* 1992; 9(1): S223-48.
6. Mori F, Himes BT, Kowada M, Murray M, Tessler A. Fetal spinal cord transplants rescue some axotomized rubrospinal neurons from retrograde cell death in adult rats. *Exp Neurol.* 1997;143:45-60.

7. Liu Y, Kim D, Himes BT, Chow SY, Schallert T, Murray M, Tessler A, Fischer I. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J Neurosci*. 1999;19:4370-87.
8. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med*. 1999;5: [??????]
9. Chow SY, Moul J, Tobias CA, Himes BT, Liu Y, Obrocka M, Hodge L, Tessler A, Fischer I. Characterization and intraspinal grafting of EGF/bFGF-dependent neurospheres derived from embryonic rat spinal cord. *Brain Res*. 2000;874:87-106.
10. Onifer SM, Cannon AB, Whittemore SR. Altered differentiation of CNS neural progenitor cells after transplantation into the injured adult rat spinal cord. *Cell Transplant*. 1997;6:327-38.
11. Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH, Jr, Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci*. 2001;21:9246-54.
12. Vastag B. Stem cells step closer to the clinic: paralysis partially reversed in rats with ALS-like disease. *JAMA*. 2001;285:1691-93.
13. Acsadi G, Anguelov RA, Yang H, Toth G, Thomas R, Jani A, Wang Y, Ianakova E, Mohammad S, Lewis RA, Shy ME. Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2002; 13:1047-59.

14. Marsala M, Kakinohana O, Yaksh TL, Tomori Z, Marsala S, Cizkova D. Spinal implantation of hNT neurons and neuronal precursors: graft survival and functional effects in rats with ischemic spastic paraplegia. *Eur J Neurosci.* 2004;20(9):2401-14.
15. Kakinohana O, Cizkova D, Tomori Z, Hedlund E, Marsala S, Isacson O, Marsala M. Region-specific cell grafting into cervical and lumbar spinal cord in rat: a qualitative and quantitative stereological study. *Exp Neurol.* 2004;190(1):122-32.
16. Shi E, Kazui T, Jiang X, Washiyama N, Yamashita K, Terada H, Bashar AH. Intrathecal injection of bone marrow stromal cells attenuates neurologic injury after spinal cord ischemia. *Ann Thorac Surg.* 2006;81(6):2227-33.
17. Cizkova D, Kakinohana O, Kucharova K, Marsala A, et al. Functional recovery in rats with ischemic paraplegia after spinal grafting of human spinal stem cells. *Neuroscience.* 2007;147:546-60.
18. Shi E, Kazui T, Jiang X, Washiyama N, Yamashita K, Terada H, Bashar AH. Therapeutic benefit of intrathecal injection of marrow stromal cells on ischemia-injured spinal cord. *Ann Thorac Surg.* 2007;83(4):1484-90.
19. Anderson DK, Howland DR, Reier PJ. Fetal neural grafts and repair of the injured spinal cord. *Brain Pathol.* 1995;5:451-7.
20. Park KS, Choi MR, Jung KH, Kim S, Kim HY, Kim KS, Cha EJ, Kim Y, Chai YG. Diversity of ion channels in human bone marrow mesenchymal stem cells from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2008;12(6):337-42.

21. Zigova T, Song S, Willing AE, Hudson JE, Newman MB, Saporta S, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant*. 2002;11(3):265-74.
22. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000;290(5497):1779-82.
23. Chen J, Li Y, Wang L, Zhenggang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001;32:1005-11.
24. Chen J, Zhang ZG, LiY, Wang L, Xu YX, Gautam SC, Lu M, Zhu Z, Chopp M. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the boundary zone after stroke in rats. *Circ Res*. 2003;92:692-99.
25. Young W. Spinal cord contusion models. *Prog Brain Res*. 2002;137: 231-55.
26. Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine*. 2004;29(18):1971-9.
27. Harris DT. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications. *Stem Cell Rev*. 2008;4(4):269-74.

28. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002;174(1):11-20.
29. Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR. Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematother. Stem Cell Res*. 2003;12:271-8.
30. Nishio Y, Koda M, Kamada T, Someya Y, Yoshinaga K, Okada S, Harada H, Okawa A, Moriya H, Yamazaki M. The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats. *J Neurosurg Spine*. 2006;5(5):424-33.
31. Lim JY, Jeong CH, Jun JA, Kim SM, Ryu CH, Hou Y, Oh W, Chang JW, Jeun SS: Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(5):38-40.
32. Stys PK. Anoxic and ischemic injury of myelinated axons in CNS white matter: from mechanistic concepts to therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18(1):2-25.

33. Marsala M, Sorkin LS, Yaksh TL. Transient spinal ischemia in rat: characterization of spinal cord blood flow, extracellular amino acid release, and concurrent histopathological damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:604–14.
34. Saganova K, Marsala M. Intrathecal administration of dizocilpine maleate (MK-801) attenuates ischemic damage in the rabbit spinal cord. *Exp Neurol.* 1994;130:337-43.
35. Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol.* 1998;18:667–82.
36. Lombardi V, Valko L, Stolc S, Valko M, Ondrejickova O, Horakova L, Placek J, Troncone A. Free radicals in rabbit spinal cord ischemia: electron spin resonance spectroscopy and correlation with SOD activity. *Cell Mol Neurobiol.* 1998;18:399–412.
37. Akins PT, Atkinson RP. Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Curr Med Res Opin.* 2002;18(Suppl 2):s9–13.
38. Stys PK . General mechanisms of axonal damage and its prevention. *J Neurol Sci.* 2005;233:3–13.
39. Zivin JA, DeGirolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. *Stroke.* 1980;11:200–02.
40. Tarlov IM. Rigidity in man due to spinal interneuron loss. *Arch Neurol.* 1967;16:536–43.

41. Taira Y, Marsala M. Effect of proximal arterial perfusion pressure on function, spinal cord blood flow, and histopathologic changes after increasing intervals of aortic occlusion in the rat. *Stroke*. 1996;27:1850-8.
42. Giulian D, Robertson C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann Neurol*. 1990;27:33-42.
43. Bicknell CD, Riga CV, Wolfe JH. Prevention of paraplegia during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009;37(6):654-60.
44. Kieffer E, Fukui S, Chiras J, Koskas F, Bahnini A, Cormier E. Spinal cord arteriography: a safe adjunct before descending thoracic or thoracoabdominal aortic aneurysmectomy. *J Vasc Surg*. 2002;35(2):262-8.
45. Dommissse GF. The blood supply of the spinal cord. A critical vascular zone in spinal surgery. *J Bone Joint Surg Br*. 1974;56(2):225-35.
46. Svensson LG, Klepp P, Hinder RA. Spinal cord anatomy of the baboon--comparison with man and implications for spinal cord blood flow during thoracic aortic cross-clamping. *S Afr J Surg*. 1986;24(1):32-4.
47. Cambria RP, Clouse WD, Davison JK, Dunn PF, Corey M, Dorer D. Thoracoabdominal aneurysm repair: results with 337 operations performed over a 15-year interval. *Ann Surg*. 2002;236(4):471-9.
48. Morishita K, Murakami G, Fujisawa Y, Kawaharada N, Fukada J, Saito T, Abe T. Anatomical study of blood supply to the spinal cord. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(6):1967-71.

49. Safi HJ, Miller CC 3rd, Carr C, Iliopoulos DC, Dorsay DA, Baldwin JC. Importance of intercostal artery reattachment during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 1998;27(1):58-66.
50. Kakinohana M, Nakamura S, Fuchigami T, Sugahara K. Transcranial motor-evoked potentials monitoring can detect spinal cord ischemia more rapidly than spinal cord-evoked potentials monitoring during aortic occlusion in rats. *Eur Spine J.* 2007;16(6):787-93.
51. Contreras ISB, Moreira LFP, Ballester G, de Mônaco AB, Lancellotti CLP, Dias AR, Oliveira SA. Immediate ischemic preconditioning based on somatosensory evoked potentials seems to prevent spinal cord injury following descending thoracic aorta cross-clamping. *Eur J of Cardiothoracic Surg.* 2005;28:274-79.
52. Mônaco BA, Benício A, Contreras IS, Mingrone LE, Ballester G, Moreira LF. Ischemic preconditioning and spinal cord function monitoring in the descending thoracic aorta approach. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88(3):291-6.
53. Davison JK, Cambria RP, Vierra DJ, Columbia MA, Koustas G. Epidural cooling for regional spinal cord hypothermia during thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 1994;20(2):304-10.
54. Coselli JS, LeMaire SA, Koksoy C, Schmittling ZC, Curling PE. Cerebrospinal fluid drainage reduces paraplegia after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: results of a randomized clinical trial. *J Vasc Surg.* 2002;35:631-39.

-
55. Wynn MM, Mell MW, Tefera G, Hoch JR, Acher CW. Complications of spinal fluid drainage in thoracoabdominal aortic aneurysm repair: a report of 486 patients treated from 1987 to 2008. *J Vasc Surg.* 2009;49(1):29-34; discussion 34-5.
 56. Coselli JS. The use of left heart bypass in the repair of thoracoabdominal aortic aneurysms: current techniques and results. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;15(4):326-32.
 57. Coselli JS, LeMaire SA. Left heart bypass reduces paraplegia rates after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Ann Thorac Surg.* 1999;67(6):1931-4.
 58. Coselli JS, LeMaire SA, Conklin LD, Adams GJ. Left heart bypass during descending thoracic aortic aneurysm repair does not reduce the incidence of paraplegia. *Ann Thorac Surg.* 2004;77(4):1298-303.
 59. Lang-Lazdunski L, Matsushita K, Hirt L, Waeber C, Vonsattel JP, Moskowitz MA, Dietrich WD. Spinal cord ischemia. Development of a model in the mouse. *Stroke.* 2000; 31:208 –13.
 60. Follis F, Scremin OU, Blisard KS, Scremin AME, Pett SB, Scott WJ, Kessler RM, Wernly JA. Selective vulnerability of white matter during spinal cord ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13:170-8.

61. Stone DH, Albadawi H, Conrad MF, Entabi F, Stoner MC, Casey PJ, Cambria RP, Watkins MT. PJ34, a poly-ADPribose polymerase inhibitor, modulates visceral mitochondrial activity and CD14 expression following thoracic aortic ischemia-reperfusion. *Am J Surg.* 2009;198:250 –5.
62. Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts, part 1: Normal spinal cord. *Neurosurgery.* 1993;33:277-84.
63. Scremin OU. *Cerebral vascular system.* 2a ed. San Diego, CA: Paxinos GT; 2005. p 3–35: The rat nervous system.
64. Awad H, Ankeny DP, Guan Z, Wei P, McTigue DM, Popovich PG. A mouse model of ischemic spinal cord injury with delayed paralysis caused by aortic cross-clamping. *Anesthesiology.* 2010;113(4):880-91.
65. Sharp J, Keirstead HS. Therapeutic applications of oligodendrocyte precursors derived from human embryonic stem cells. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18(5):434-40.
66. Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40(7):609-19.
67. Rossi SL, Keirstead HS. Stem cells and spinal cord regeneration. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20(5):552-62.

-
68. Nandoe Tewarie RS, Hurtado A, Bartels RH, Grotenhuis A, Oudega M. Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 2009;32(2):105-14.
 69. Ha Y, Choi JU, Yoon DH, Yeon DS, Lee JJ, Kim HO, Cho YE. Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro. *Neuroreport.* 2001;12(16):3523-7.
 70. Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol.* 2001;171(1):109-15.
 71. Bicknese AR, Goodwin HS, Quinn CO, Henderson VC, Chien SN, Wall DA. Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplant.* 2002;11(3):261-4.
 72. Lu L, Shen RN, Broxmeyer HE. Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1996;22(2):61-78.
 73. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000;290(5497):1775-9.
 74. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;61(4):364-70.

75. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
76. Honmou O, Onodera R, Sasaki M, Waxman SG, Kocsis JD. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Trends Mol Med*. 2012;18(5):292-7.
77. Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke*. 2004;35(10):2385-9.
78. Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, et al. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia* 2002;39:229–36.