
Gustavo Bispo dos Santos

**Estudo do uso de células-tronco de linhagem neuronal em modelo experimental de
lesão medular aguda**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante
CoOrientador: Profa. Dra. Luciana Amaral
Haddad

SÃO PAULO
2023

Gustavo Bispo dos Santos

**Estudo do uso de células-tronco de linhagem neuronal em modelo experimental de
lesão medular aguda**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante

CoOrientador: Profa. Dra. Luciana Amaral
Haddad

SÃO PAULO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Gustavo Bispo dos
Estudo do uso de células-tronco de linhagem
neuronal em modelo experimental de lesão medular
aguda / Gustavo Bispo dos Santos. -- São Paulo,
2023.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientador: Alexandre Fogaça Cristante .
Coorientadora: Luciana Amaral Haddad.

Descritores: 1.Traumatismos da medula espinal
2.Células-tronco neurais 3.Transplante de células

USP/FM/DBD-193/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por participarem ativamente de toda minha formação e me darem exemplos na condução moral e ética de toda minha vida.

À minha esposa, pelo apoio e compreensão, sendo o alicerce de nossa família o tempo todo.

Ao meu filho, por me mostrar que dificuldades existem para nos fortalecer.

Ao meu irmão, por ser meu companheiro em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Manoel e Fátima, que sempre me incentivaram e proporcionaram meus estudos, o que, apesar de toda dificuldade, foi prioridade em suas vidas. Sem o apoio deles, não seria possível continuar em frente.

Ao meu querido irmão, Kauê, que sempre me incentivou em todas as fases de minha vida.

À minha querida esposa, que sempre esteve ao meu lado e entendeu toda dificuldade e ausência durante minha formação.

Ao meu amado filho, que em tão pouco tempo já me mostrou que faz valer a pena.

Aos meus sobrinhos, Heloísa e Enrico, por todo amor e carinho.

A todos os meus amigos e familiares.

Ao Prof. Alexandre Fogaça Cristante, por todo apoio em minha trajetória e formação acadêmica.

Ao Prof. Raphael Martus Marcon, por me proporcionar todo aprendizado no estudo do trauma raquimedular.

Ao Prof. Rames Mattar Jr., pela confiança em mim e no meu trabalho.

Ao Prof. Teng Hsiang Wei, por sempre apoiar meus projetos de vida.

Ao Prof. Marcelo Rosa de Rezende, por ter acompanhado desde o início minha trajetória acadêmica.

Agradecimentos

Ao Prof. Arnaldo Valdir Zumiotti (*in memoriam*), por todo apoio no início de minha vida acadêmica.

Ao Prof. Roberto Guarniero, por toda amizade e confiança em meu trabalho.

Ao Prof. Tarcísio Eloy Pessoa Barros Filho, por todo apoio de sempre.

Ao Prof. Olavo Pires de Camargo, pelo incentivo contínuo à pesquisa.

À Sra. Jane Donini dos Santos Ferreira, pela amizade e por todo apoio administrativo no laboratório de microcirurgia.

À Sra. Maria do Carmo Nunes, pela amizade e todo apoio técnico no centro de pesquisas.

Ao biólogo Flávio Nascimento, pela amizade e por todo suporte na fase de avaliações histológicas.

EPIGRAFE

*A reação mais comum da mente humana a uma conquista não é satisfação, e sim o
anseio por mais.*

Yuval Noah Harari

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação 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 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*.

Nomes das estruturas anatômicas: Terminologia Anatômica Internacional da Federative Committee on Anatomical Terminology aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. 1ed. São Paulo: Editora Manole, 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5ed, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto no 6583/2008.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
4. MÉTODOS.....	34
4.1 Cultivo celular.....	34
4.2 Cultivo primário de neuroferas.....	34
4.3 Passagem, congelamento de neuroesferas.....	35
4.4 Tratamento de diferenciação neuronal <i>in vitro</i>	35
4.5 Animais para procedimento cirúrgico.....	36
4.6 Grupos de estudo.....	37
4.6.1 Grupos controle.....	37
4.6.2 Grupos experimentais.....	37
4.7 Procedimento cirúrgico.....	38
4.7.1 Modelo de lesão medular	39
4.7.2 Protocolo pós-operatório.....	43
4.8 Medidas funcionais de desfecho.....	43
4.9 Medidas morfológicas de desfecho.....	43
4.10 Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS.....	47
5.1 Cultivo primário de neuroesferas.....	47
5.2 Procedimento cirúrgico e avaliação do estado geral dos animais.....	48
5.3 Avaliação funcional motora pela escala BBB.....	50
5.4 Análise morfológica da medula espinal.....	57

5.5	Avaliação de ganho de peso dos animais pós-operatório.....	59
6.	DISCUSSÃO.....	63
6.1	Células-tronco.....	65
6.2	Enxertos de neuroesferas em lesão experimental da medula espinal torácica de ratos.....	66
6.3	Modelos de lesão contusiva da medula espinal torácica.....	68
7.	CONCLUSÃO.....	73
8.	REFERÊNCIAS.....	75
9.	ANEXO.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variâncias
ASIA	<i>American Spine Injury Association</i>
BBB	Basso, Beattie e Bresnam
CM	Meio condicionado
CS	Células de Schwann
CT	Células-tronco
CTN	Células-tronco neurais
DP	Desvio padrão
DIV	Dias <i>in vitro</i>
EGG	Equações de estimação generalizadas
ENMG	Eletroneuromiografia
FMUSP	Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
GM1	Monosialogangliosídeo sódico
HE	Hematoxilina-eosina
hfNPC	Células progenitoras neurais fetais humanas
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
LETRAN	Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos
MASCIS	<i>Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study</i>
MSC	Haste mesenquimal
MLG	Modelos lineares generalizados
MWM	Mobilização com movimento
NASCIS	<i>National Acute Spinal Cord Injury Study</i>
NYU	<i>New York University</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PO ₂	Pressão de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
TCE	Trauma cranioencefálico
TRM	Trauma raquimedular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Procedimentos cirúrgicos associados a cada grupo, controle (1 a 3) ou experimental (4 a 6).....	38
Figura 2 –	Equipamento de anestesia inalatória.....	39
Figura 3 –	Máscara para anestesia inalatória.....	39
Figura 4 –	Animal posicionado em decúbito esternal e incisão em região dorsal.....	40
Figura 5 –	Animal posicionado para ser submetido à contusão medular e contato inicial do equipamento com a medula.....	41
Figura 6 –	Calibração do MASCIS Impactor.....	41
Figura 7 –	Sutura em bloco da musculatura dorsal.....	42
Figura 8 –	Sutura cutânea.....	42
Figura 9 –	Neuroesferas obtidas em suspensão de vesícula telencefálica de ratos em E14 e semeadas após 7DIV, em meio de diferenciação neuronal, sobre placa revestida com poli-D-lisina (diferenciação 2D) ou ressuspensas em Matrigel® que foi posteriormente gelificado a 37°C (diferenciação 3D). Cultivo por 16 horas ou 60 horas, como indicado. Imagens obtidas em campo claro ao microscópio Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha) conjugado à câmera AxioCam MRC5 camera (Zeiss). Barra de escala: 25 µm.....	47
Figura 10 –	Cultura de prosencéfalo dissociado de ratos em P1–P2 produz neuroesferas flutuantes que se diferenciam em células com fenótipo neuronal. As neuroesferas formadas após a terceira passagem (painel superior, “Suspensão”) mostram tamanho crescente ao longo de duas semanas <i>in vitro</i> . O tratamento de diferenciação neuronal 2D das neuroesferas na terceira passagem (painéis do meio e inferior) indica a processos celulares com comprimentos crescentes de 1 DIV a 7 DIV.	

	Todas as imagens foram obtidas por microscopia de campo claro usando o microscópio Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha) e a câmera conjugada AxioCam MRC5 (Zeiss). Barras de escala: 50 µm.....	48
Figura 11 –	(A) Gráficos do escore na escala BBB para os grupos controle, 1–3, e para os grupos de teste (célula), 4–6, conforme indicado. O escore BBB é representado por média e desvio padrão (IC 95%) de acordo com a avaliação realizada no D2 e na S1, S2, S3, S4, S5 e S6 de pós-operatório. (B) Análise post hoc de Dunn do escore BBB para cinco grupos, conforme indicado. Os quadrados brancos e cinzas indicam, respectivamente, comparações não significativas ($p > 0,05$) e significativas ($p < 0,05$) de escores entre o(a) dia/semana indicado(a) à esquerda e cada período da respectiva coluna para cada grupo.....	56
Figura 12 –	Gráfico de barras da diferença entre as médias de valores BBB (IC 95%) para a S6 e a S3. A diferença média para cada grupo representado no eixo X foi subtraída da diferença média do grupo de referência indicado no topo de cada gráfico. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas (Bonferroni; $p < 0,05$) com relação ao grupo de referência.....	57
Figura 13 –	Gráficos das análises histológicas de acordo com a presença de necrose (A), eritrócitos (B) e leucócitos (D). A legenda indica os graus de avaliação (Gr) como Gr0 (ausente), Gr1 (discreta), Gr2 (moderada) ou Gr3 (acentuada). A distribuição se dá de acordo com o número de animais em cada grupo (de dez) classificados no respectivo grau.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Peso corpóreo dos animais dos seis grupos, antes do procedimento cirúrgico e na sexta semana (S6) e a diferença (Δ) entre eles.....	50
Tabela 2 –	Pontuação na escala BBB de animais dos seis grupos, em sete dias experimentais (D2, S1, S2, S3, S4, S5 e S6).....	51
Tabela 3 –	Escore na escala BBB de animais de cada um dos grupos em momentos diferentes da avaliação.....	54
Tabela 4 –	Descrição dos parâmetros histológicos segundo grupos e resultado das comparações.....	59
Tabela 5 –	Descrição do peso dos animais, segundo grupos, no início e ao final do estudo e variações de peso e resultado das comparações das variações entre os grupos.....	60
Tabela 6 –	Resultado das comparações múltiplas do peso entre grupos e momentos avaliados.....	61

RESUMO

Santos GB. Estudo do uso de células-tronco de linhagem neuronal em modelo experimental de lesão medular aguda [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2023

Introdução: A lesão da medula espinal é um grande problema de saúde pública com complicações clínicas e psicológicas devastadoras relacionadas à disfunção neuronal sensorial, motora e autônoma. Embora a laminectomia seja o procedimento cirúrgico padrão-ouro para descomprimir o canal medular, ele demonstra melhora clínica limitada em pacientes com medula espinal contusa ou seccionada. Portanto, várias abordagens têm sido estudadas para melhorar seu resultado clínico. Modelos experimentais de lesão medular têm sido utilizados ao entendimento da regeneração e reorganização promovida por diferentes tipos de terapias adjuvantes, farmacológicas ou pela aplicação de suportes químicos ou biológicos (*scaffolding*), fatores de crescimento e células-tronco. O modelo da contusão da medula espinal em ratos pela queda de peso (NYU-Impactor) foi anteriormente padronizado e validado por nosso grupo de pesquisa através da escala de avaliação motora Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), consistindo hoje importante alicerce para pesquisas. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar, em período pós-operatório de seis semanas, a função motora de ratos que tiveram uma contusão moderada da medula espinal torácica (T8–T9), seguida imediatamente de enxerto de células-tronco neurais de telencéfalo de rato neonato não diferenciadas ou 24 horas após início de tratamento para diferenciação neuronal. E como objetivo secundário o teste do *scaffolding* Matrigel® em associação às células. **Métodos:** Foram utilizados 60 animais divididos aleatoriamente em seis grupos, submetidos a laminectomia, sendo três grupos controle e três grupos experimentais. Associaram-se os seguintes procedimentos por grupo: (1) lesão medular, (2) lesão medular e meio de diferenciação neuronal em Matrigel® (veículo), (3) nenhum outro procedimento (sham), (4) lesão medular e células não diferenciadas em meio de diferenciação neuronal, (5) lesão medular e células não diferenciadas em veículo, e (6) lesão medular e neuroesferas não diferenciadas incubadas em veículo por 24 horas. Todos os animais foram submetidos à avaliação comportamental motora pela escala BBB em dois momentos: treinados previamente à intervenção cirúrgica e posteriormente semanalmente durante seis semanas. Após seis semanas, os animais foram submetidos ao sacrifício indolor e tiveram suas medulas ressecadas do segmento vertebral (T3–L3). As medulas foram submetidas à fixação e, posteriormente, seções longitudinais e coloração com hematoxilina-eosina. Foram avaliados necrose, infiltrado celular, degeneração, hiperemia e hemorragia. **Resultados:** Como esperado, a laminectomia por si não afetou a função motora (grupo 3, sham). À avaliação no segundo dia pós-operatório, animais dos demais grupos apresentaram grave comprometimento da função motora conforme a escala BBB. A partir do final da quarta semana do período pós-operatório, houve melhora significativa na função motora de ratos com contusão moderada da medula espinal de todos os grupos. Nos grupos que receberam Matrigel®, com ou sem células de neuroesferas não diferenciadas, esta melhora foi significante de forma mais precoce, a partir do final da segunda semana pós-operatória. Dentre os cinco grupos cujos animais foram submetidos a laminectomia e lesão medular, animais que receberam Matrigel® e células-tronco neurais indiferenciadas (grupo 5) apresentaram escores mais elevados na

escala BBB. A diferença entre pontuações BBB do final do período pós-operatório e o final da terceira semana foi superior para os animais do grupo 5 em relação a qualquer outro grupo. Os parâmetros histológicos não diferiram significativamente entre grupos.

Conclusão: A melhora funcional motora em ratos com lesão contusa em T8–T9 da medula espinal foi mais significativa quando Matrigel® foi combinado a células não diferenciadas de neuroesferas no enxerto imediatamente após lesão.

Palavras-chave: Traumatismos da Medula Espinal; Células-tronco neurais; Transplante de células.

ABSTRACT

Santos GB. Use of neural stem cells in a spinal cord injury experimental model [dissertation]. “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Introduction: Spinal cord injury is a major public health issue with devastating clinical and psychological complications related to neurosensory, motor, and autonomic dysfunction. Although laminectomy is the gold standard surgical procedure to decompress the spinal cord, it shows limited clinical improvement in patients with contused or severed spinal cord. Therefore, various approaches have been studied to improve its clinical outcome. Experimental models have been used to understand the regeneration and reorganization promoted by different types of adjuvant therapies, pharmacological or by applying chemical or biological supports (scaffolding), growth factors, and stem cells. The spinal cord contusion model in rats by weight drop (NYU-Impactor) was previously standardized and validated by our research group through the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) motor assessment scale, consisting today's important foundation for research. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate, in a six-week postoperative period, the motor function of rats that had a moderate contusion of the thoracic spinal cord (T8–T9), followed immediately by grafting of neural stem cells from undifferentiated neonate rat or 24 hours after initiation of treatment for neuronal differentiation. And as a secondary objective, the testing of Matrigel® scaffolding in association with the cells. **Methods:** Sixty animals were used, randomly divided into six groups, submitted to laminectomy, three control, and three experimental groups. The following procedures were associated per group: (1) spinal cord injury, (2) spinal cord injury and medium of neuronal differentiation in Matrigel® (vehicle), (3) no other procedure (sham), (4) spinal cord injury and undifferentiated cells in medium of neuronal differentiation, (5) spinal cord injury and undifferentiated cells in vehicle, and (6) spinal cord injury and undifferentiated neurospheres incubated in vehicle for 24 hours. All animals underwent motor behavioral assessment by the BBB scale at two-time points: trained before surgical intervention and then weekly after that for six weeks. After six weeks, the animals were submitted to painless sacrifice and had their marrows resected from the vertebral segment (T3–L3). The marrows were subjected to fixation and, subsequently, longitudinal sections and stained with hematoxylin-eosin. Necrosis, cellular infiltrate, degeneration, hyperemia, and hemorrhage were evaluated. **Results:** As expected, laminectomy alone did not affect motor function (group 3, sham). At evaluation on the second postoperative day, animals in the other groups showed severe impairment of motor function according to the BBB scale. From the end of the fourth week of the postoperative period, there was a significant improvement in motor function with moderate spinal cord contusion from all groups. In the groups that received Matrigel®, with or without non-differentiated neurosphere cells, this improvement was significant earlier, starting at the end of the second postoperative week. Among the five groups whose animals underwent laminectomy and spinal cord injury, animals that received Matrigel® and undifferentiated neural stem cells (group 5) showed higher BBB scores. The difference between BBB scores from the end of the postoperative period and the end of the third week was higher for animals in group 5 than any other group. Histological parameters did not differ significantly among the groups. **Conclusion:** Motor function

improvement in rats with spinal cord contusion (T8–T9) was most significant when Matrigel® was combined with undifferentiated neurosphere cells in the graft immediately after injury.

Keywords: Spinal cord injuries; Neural stem cells; Cell transplantation.

1 INTRODUÇÃO

Gustavo Bispo dos Santos

1 INTRODUÇÃO

Lesões medulares acarretam diversos danos à vida do indivíduo. Além de serem incapacitantes, alteram a qualidade de vida, desencadeando alterações gastrointestinais, urogenitais, respiratórias e músculoesqueléticas.

O nível e grau de contusão determinam a gravidade e o prognóstico do dano neurológico. A causa mais comum ainda são os traumas, porém, alterações vasculares e neoplasias também causam importante dano neurológico.

A lesão medular apresenta dois mecanismos importantes, chamados de primário e secundário, que são danosos à medula espinal. O mecanismo primário é causado de forma mecânica e o secundário é oriundo de processos bioquímicos e celulares desencadeados pela lesão primária **(Bunge et al., 1993).**

Com incidência estimada em até 25,5 lesões por milhão por ano em países em desenvolvimento, esse tipo de lesão constitui um dano catastrófico para os pacientes acometidos **(Rahimi-Movaghar et al., 2013)**, sendo, ainda, um desafio para a medicina humana e veterinária **(Singh et al., 2008)**.

A utilização de fatores biológicos para o tratamento da lesão medular foi denominada terapia biológica. Na área de terapia celular, uma série de medidas foram testadas e dados animadores foram publicados, evidenciando-se melhora do déficit neurológico e crescimento axonal por meio de bloqueadores de fatores inibitórios de crescimento antagonistas de lesão neurológica secundária, fatores neurotróficos, substituição de mielina por células-tronco (CT), células de Schwann (CS) e da bainha olfatória, implantação de tecido fetal e implantes condutores **(Shroff 2016)**.

Após a lesão medular, a regeneração axonal é comprometida por fatores inibitórios *in situ* e pela perda de axônios maduros **(Beattie et al., 2000)**. Devido a esses fatores, os axônios são incapazes de transpor a barreira de cicatriz glial pós-traumática **(Fitch et al., 1999)**. Por outro lado, há evidências de que axônios saudáveis atravessam o foco lesional e se estendem em sentido distal em áreas sem cicatriz **(Zhou et al. 2019)**. Observa-se, assim, que a preservação de uma certa quantidade de tecido neural viável, mesmo que limitada, aumenta a probabilidade de melhora funcional **(Blight 1983; Davies et al., 1997)**.

Estudos para o entendimento e tratamento da lesão medular datam de mais de 100 anos (**Blight 1983**). As pesquisas com objetivos terapêuticos para casos de lesão medular têm se concentrado em reduzir a lesão secundária e promover a regeneração axonal (**Martins et al., 2005**). Há vários modelos experimentais reprodutíveis de lesão medular na literatura, porém, em sua maioria, estes são de difícil reprodutibilidade, alto custo e, principalmente, grande variabilidade pós-lesão (**Santos et al., 2011**). Entre eles, Wise Young padronizou condições para o emprego de um aparelho que causa lesão medular traumática (**Young, 2009**), abrindo um novo horizonte para pesquisas neste campo. Ademais, foi desenvolvido um protocolo de avaliação motora para a avaliação neurológica de ratos, a escala Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) (**Basso et al., 1995**).

Em modelos animais, o aumento do número de brotamento axonal e fibras mielinizadas e a melhora funcional nos testes motores tiveram relação com o emprego de CT mesenquimais obtidas de tecido adiposo, medula óssea e cordão umbilical, entre outros tecidos (**Park et al., 2012**).

Estudos mais recentes têm avaliado a ação de CT no tratamento da lesão medular aguda com o objetivo de regeneração neuronal (**Shroff, 2016**).

Além do trauma raquimedular (TRM), milhões de pessoas são acometidas por traumas cranioencefálicos (TCEs), e a maioria das terapias clínicas não apresentam bons prognósticos (**Nudi et al., 2015**).

Algumas linhas de pesquisa demonstraram melhora motora significativa com a utilização de células-tronco neurais (CTN) em ratos submetidos à contusão de córtex frontal medial (**Nudi et al., 2015**).

O emprego de tecido neural como enxerto para o reparo de lesões medulares precedeu o uso de CT em modelos animais (**Nornes, 1983**). Nas últimas duas décadas, CTN têm tido uma ampla faixa de experimentação em modelos de lesão do sistema nervoso central (SNC) ou periférico (**Salomone et al., 2013**).

As CTN são células multipotentes, com capacidade de autorrenovação e diferenciação em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (**Trujillo et al., 2009**). As CTN do adulto residem no encéfalo, na zona subventricular, no giro denteado do hipocampo ou bulbo olfatório (**Trujillo et al., 2009**) e na medula espinal. Em fase pós-natal, as CTN geram neurônios funcionais continuamente, um processo crítico para o olfato e a aprendizagem. Em condições patológicas, como acidente vascular cerebral ou lesão raquimedular, há aumento dos índices de proliferação de CTN e neurogênese, e novos

neurônios têm habilidade para migrar ao sítio de lesão e fazer novas sinapses. Estudos com modelos experimentais de lesão medular em ratos mostraram que CTN da medula espinal apresentam comportamento semelhante (**Mizushima et al., 2001**).

Os indivíduos lesados medulares possuem grande limitação de atividades diárias, por isso, vários pesquisadores têm estudado estratégias terapêuticas visando a melhorar o quadro da habilidade motora e até mesmo a fisiologia funcional de alguns órgãos (**Alexander et al., 2009**).

Ainda não está claro se as terapias celulares e farmacológicas auxiliam em uma melhora motora significativa, então, o presente estudo visa a preencher esta lacuna para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na regeneração neuronal e recuperação funcional pós TRM.

2 OBJETIVOS

Gustavo Bispo dos Santos

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar, em período pós-operatório de seis semanas, a função motora de ratos que tiveram uma contusão moderada da medula espinal torácica (T8–T9), seguida imediatamente de enxerto de CTN de telencéfalo de rato neonato não diferenciadas ou 24 horas após início de tratamento para diferenciação neuronal. E como objetivo secundário o teste do *scaffolding* Matrigel® (Corning, New York, NY, EUA) em associação às células.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Gustavo Bispo dos Santos

3 REVISÃO DA LITERATURA

Schmaus (1890) foi o primeiro a estudar lesões medulares com modelo experimental em coelhos, por meio de uma contusão utilizando uma tábua presa nas costas do animal. É possível observar um modelo efetivo de lesão medular.

Utilizando o mesmo modelo, **Scagliosi (1898)** estudam alterações medulares e descrevem a degeneração da bainha de mielina e de células neuronais dos cornos anteriores da medula espinal.

Allen (1911) desenvolve um modelo experimental reproduzível e fiel de lesão medular em cães, baseado na queda de peso direto na medula espinal, modelo este conhecido como queda de peso. O autor diferencia níveis de contusão baseado na relação peso x altura.

Allen (1914) relata que quanto maior o peso do impacto produzido, mais severa é a contusão; sendo assim, um peso de 240 g produz uma contusão leve, enquanto um peso de 400 g produz uma lesão severa. Observa-se hemorragia e edema na substância cinzenta. O autor afirma, ainda, que a redução da pressão intramedular está associada a uma melhora clínica e que o aumento da pressão oriunda de hemorragia e edema agrava a necrose pós-lesão traumática.

McVeigh (1923) estuda as mudanças ocorridas em cães submetidos à lesão da medula espinal por compressão digital no nível T7–T8 e em medulas espinais obtidas de cadáveres frescos também submetidas à compressão entre os dedos. Observa-se edema na coluna lateral e anterior 8 horas após a lesão, que progride até o segundo dia. Há presença de hemorragia na substância cinzenta, que se estende acima e abaixo do nível da lesão e através da substância branca anterior e lateral. O autor acredita que as lesões experimentais produzidas em cães e em medulas espinais humanas obtidas de necropsia são comparáveis às lesões medulares que ocorrem nos homens em todos os aspectos, especialmente no que diz respeito aos fatores mecânicos que causam a lesão e às mudanças observadas nas alterações histológicas.

Holdsworth (1970) revolucionou o tratamento por meio da classificação das fraturas em estáveis e instáveis. O autor define as lesões completas como aquelas em que não há função neurológica nos níveis distais à lesão (podendo ser reversíveis ou irreversíveis), não ocorrendo recuperação neurológica e com persistência de déficit depois de finalizada a fase de choque medular.

Tarlov et al. (1953) realizam estudo experimental em cães, produzindo compressão medular gradual, e estudam a perda e a recuperação da função sensitiva e motora nestes animais. Os autores utilizam um balão introduzido na região torácica média por meio de laminectomia de T12 que, quando inflado, produz a lesão medular compressiva extradural. Apresentam um método de avaliação da função locomotora em animais que sofreram lesão medular experimental e concluem que a recuperação funcional, após aumento gradual da compressão extradural, depende da duração da compressão empregada para produzir a paralisia.

Woodard e Freeman (1956) estudam experimentalmente a isquemia da medula espinal em 27 cães adultos através da secção dos vasos sanguíneos junto aos pares de raízes nervosas de T9 a T10. Os animais foram sacrificados entre uma e quatro semanas após a lesão. Encontram alterações precoces na avaliação histológica. Na isquemia leve, há a perda de neurônios no corno dorsal, seguida por redução da substância cinzenta posterior com separação passiva dos elementos neurais intersticiais e pela formação de cavitação. Em graus mais graves de isquemia, ocorre necrose através dos tratos longos e dos elementos neurais e redução no número de neurônios, produzindo um quadro de mielomalácia com cavitação.

Ducker e Hamit (1969) avaliam tratamentos experimentais em cães submetidos à lesão experimental por queda de peso de 25 g de uma altura de 15 cm. Comparam quatro grupos, a saber, grupo 1: controle, sem tratamento específico; grupo 2: animais que receberam tratamento com hipotermia local por meio da irrigação da ferida com solução salina circulando por um tubo com água gelada a 0 °C na taxa de 75 ml/min a 100 ml/min; grupo 3: animais tratados com administração de dexametasona aplicada por via intramuscular três horas após a lesão – a dose de dexametasona é de 0,5 mg/kg/24 h no dia do trauma e 0,24 mg/kg/24 h no primeiro dia de pós-operatório, administrada em doses divididas; doses de 1,3 mg/kg/24 h de metilprednisolona foram administradas nos sete dias subsequentes; e grupo 4: animais que receberam uma única dose de metilprednisolona de 8 mg/kg, intratecal, administrada sob visão direta. A avaliação da recuperação neurológica é baseada na escala de função motora de Tarlov. Observam melhora estatisticamente significativa e melhor recuperação neurológica nos grupos que recebem dexametasona intramuscular e hipotermia local.

Holdsworth (1970) publica artigo baseado na observação de mais de 1.000 pacientes paraplégicos ou tetraplégicos traumáticos. Descreve a anatomia e os

mecanismos de trauma, as características radiográficas e o diagnóstico da lesão neurológica. Mostra casos com fraturas estáveis, luxações e fraturas-luxações, fraturas rotacionais e fraturas por cisalhamento. O autor defende que a presença de sensibilidade sacral e função motora distal à lesão são indicativos de uma lesão medular incompleta. Advoga, ainda, pela redução aberta e a fixação interna das fraturas, com placas inseridas nos processos espinhosos, com o objetivo de restaurar o alinhamento da coluna e prover melhores condições de recuperação neurológica. Recomenda, cautela quanto à realização de laminectomia em pacientes com lesão medular devido à falha em demonstrarem recuperação neurológica significativa e ao aumento do potencial desses pacientes de desenvolverem deformidades espinais tardias e piora do déficit neurológico.

Kelly Jr. et al. (1970) avaliam os efeitos da hipotermia local e os níveis de oxigênio tecidual em cães submetidos à lesão por impacto de queda de peso, concluindo que a hipotermia oferece uma proteção à medula espinal traumatizada, pela diminuição da demanda metabólica.

Ducker et al. (1971) realizam estudo prospectivo randomizado com 32 macacos Rhesus pesando entre 4 kg e 8 kg submetidos a trauma por queda de peso de 10 g, 15 g, 20 g e 25 g, em forma de cilindro, da altura de 20 cm, de forma que a resultante do impacto sobre a medula é de 200 g.cm, 300 g.cm, 400 g.cm e 500 g.cm, respectivamente. Os animais são divididos em quatro grupos de oito animais cada, sendo que cada grupo é randomizado novamente dentro das categorias aguda e subaguda, sendo os primeiros sacrificados seis horas após a lesão e os últimos, cinco a seis dias após a lesão. Os achados patológicos na microscopia são graduados sem conhecimento da quantidade prévia de trauma. Nos animais categorizados como agudos, o edema hemorragia petequial, a hemorragia em chama e o hematoma globular são graduados em leve, moderado e grave. Nos animais subagudos, o edema, a desmielinização, a necrose, a hemorragia, e a deformidade vascular também são similarmente graduados. Os animais subagudos também são submetidos a teste neurológico motor, sendo o exame sensitivo considerado não objetivo. Os níveis funcionais são graduados de zero a quatro, onde 0 = capacidade de correr com pequeno ou com nenhum déficit motor; 1 = capacidade de ficar em pé, caminhar e correr, embora com espasticidade; 2 = bom movimento dos membros, os quais permitem ao animal ficar em pé, mas não andar; e 4 = paraplegia completa, sem nenhum movimento voluntário. Observam que os vários graus de progressão do trauma medular, desde uma pequena área de necrose central até uma extensa necrose central, bem como

necrose periférica, são dependentes e diretamente relacionados com a gravidade do trauma. Não concluem o motivo pelo qual a substância cinzenta é mais vulnerável, mas postulam que, provavelmente, a anatomia, o metabolismo celular, o suprimento arterial e a drenagem venosa contribuem para o efeito cumulativo da fragilidade do centro da medula. Concluem que o desenvolvimento das mudanças patológicas não é paralelo às condições clínicas, pois, enquanto pode haver melhora nos achados clínicos, as mudanças patológicas podem ser progressivas em gravidade por aproximadamente uma semana, mesmo na presença de melhora clínica, que as mudanças são inicialmente mais proeminentes no centro da medula, mesmo sendo o trauma dirigido à sua superfície, e que a localização e a progressão da área medular lesada são dependentes da quantidade de trauma aplicado. Em traumas leves, em que o animal se recupera, as mudanças são somente centrais. Em traumas moderados, com paresia significativa, as mudanças também envolvem a substância branca adjacente. Em traumas graves, com resultante paraplegia, as mudanças envolvem toda a substância medular.

Fairholm e Turnbull (1971) estudam prospectivamente 34 coelhos, pesando entre 2 kg e 3 kg, e cinco cães com modelo de contusão por queda de peso. Os animais são sacrificados em tempos variáveis, desde 19 minutos até 14 dias após a lesão. Após o sacrifício, os animais são infundidos com solução coloidal de bário e a microangiografia, feita sete a 14 dias após o traumatismo, define duas zonas de lesão na medula espinal. Na zona 1, localizada na porção póstero-central da medula espinal, os capilares perdem progressivamente a capacidade de condução de sangue, e na zona 2, ao redor da zona 1, o padrão microvascular é normal. Concluem que a recuperação dos neurônios e axônios danificados depende da preservação da microcirculação.

Wagner Jr et al. (1971) apresentam um estudo prospectivo com 27 macacos Rhesus adultos utilizando o modelo de impacto por queda de peso de 20 g de uma altura de 15 cm, gerando uma força de contusão de 300 g.cm ao nível de T10. Esses animais (n=18) são divididos em cinco grupos e os segmentos da medula sujeitos ao trauma são removidos em diferentes intervalos de tempo pós-contusão: 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 4 horas. Em nove animais, a laminectomia é realizada, mas a medula espinal não é traumatizada, servindo estes como grupo controle. Um adicional de quatro animais são traumatizados e mantidos vivos durante seis meses, durante os quais são realizados frequentemente exames motores. Notam que, nesse grupo, denominado grupo crônico, todos os animais apresentam paralisia sensitiva e motora completa dos membros

inferiores. Dentro de 12 horas, movimentos isolados dos dedos estão presentes; em torno de 24 horas, frágeis respostas de reação são obtidas aos estímulos dolorosos; entre sete e 10 dias, todos os animais são capazes de se mover facilmente em suas gaiolas; e, em seis meses, os animais são indistinguíveis dos não operados. Nas observações da microscopia em relação aos vasos sanguíneos, nota-se que, em cinco minutos, a aparência da medula espinal não está grandemente alterada, estando os vasos com menos fibras musculares ao redor do canal central, distendidos, mas intactos, sendo observados fluidos serosos, mas não formação de trombos. Em 15 minutos, rupturas isoladas de vasos mais finos, com extravasamento de eritrócitos para os espaços perivasculares, são observadas dentro da substância cinzenta central. Em 30 minutos, os eritrócitos e o fluido seroso são notados em discretas coleções nos espaços perivasculares e estendem-se dentro e ao redor do parênquima. Essas alterações concentram-se principalmente nas áreas do canal central, mas incluem também o corno dorsal. Entre uma e quatro horas, as hemorragias perivasculares, inicialmente discretas, começam a coalescer. Essas alterações não estão mais confinadas ao canal central e ao corno dorsal, mas são evidentes na substância branca. As alterações edematosas menos marcantes observadas nas camadas mais internas da substância branca, em contraste com as mudanças hemorrágicas na substância cinzenta, explicam, em parte, a natureza transiente da paraplegia.

Kelly Jr. et al. (1972) publicam um estudo prospectivo em 40 cães adultos, sem raça definida, submetidos à lesão por impacto da medula espinal e divididos em quatro grupos: o grupo controle não recebe nenhuma terapia, excluídos os suportes necessários; o grupo 1, denominado tratamento imediato, é exposto, uma hora após a lesão medular, a 100% de oxigênio a 2 atm. por quatro horas; o grupo 2, denominado tratamento retardado, é submetido, após um período de quatro horas da lesão, às mesmas condições e ao mesmo tempo que o grupo 1; e o grupo 3, denominado tratamento seriado, recebe, uma hora após a lesão, 100% de oxigênio a 2 atm. por quatro horas, e esse tratamento é repetido em 24 horas e em 48 horas. Encontram que, no grupo não tratado, nove animais são incapazes de caminhar e, destes, quatro ficam completamente paraplégicos. No grupo 1, sete cães apresentam boa recuperação e, destes, quatro são considerados normais. No grupo 2, nove animais apresentam boa recuperação e um animal apresenta grande incapacidade e função urinária anormal. No grupo 3, a taxa de recuperação é idêntica à do grupo 2. Notam que a medula espinal traumatizada se torna muito hipóxica por um período de 30 minutos após lesão. Inalação com oxigênio a 100% não afeta esses níveis, mas, com oxigênio

hiperbárico a 2 atm., é possível aumentar a pressão de oxigênio (PO₂) tecidual na medula espinal traumatizada.

Tator e Deecke (1973) estudam o valor das perfusões hipotérmica e normotérmica e da durotomia em lesão experimental em macacos Rhesus. Observam que a perfusão, hipotérmica ou normotérmica, melhora a recuperação neurológica, mas, em compressões maiores, somente a perfusão normotérmica produz melhora significativa. Esses resultados indicam que não se pode afirmar que a perfusão exerça efeito benéfico, mas sugerem que a diálise de substâncias nocivas da medula espinal lesada tem um importante papel na recuperação neurológica.

De La Torre et al. (1975) estudam 32 cães submetidos à lesão experimental por queda de peso e avaliam o tratamento com drogas. Dividem os animais em quatro grupos de oito cães, que são submetidos a tratamento com solução salina, manitol, dexametasona e dimetil-sulfóxido. Encontram que a utilização de solução salina isotônica e de manitol é incapaz de reverter a paralisia. Cães que recebem dimetil-sulfóxido (6 de 8) ou dexametasona (2 de 8) têm recuperação parcial ou total da função.

Hansebout et al. (1975) estudam os efeitos da hipotermia e dos corticosteroides no tratamento de cães fêmeas adultas submetidas à lesão experimental da medula espinal pelo método de compressão com balão, por um período de uma hora. Os animais submetidos à experimentação são divididos em cinco grupos: somente laminectomia; laminectomia + aparato de troca de calor a 37 °C; laminectomia + lesão; laminectomia + lesão + corticosteroide; e laminectomia + lesão + resfriamento a 6 °C por quatro horas. Observam, em sete semanas, que os grupos que recebem tratamento com qualquer corticosteroide ou com resfriamento conseguem taxas de recuperação motora significativamente superiores às do grupo não tratado, sendo que o grupo não tratado é incapaz de caminhar, enquanto ambos os grupos tratados são. Os grupos que não sofrem lesão necessitam de duas semanas para total recuperação motora, não havendo diferença significativa entre o grupo em que é realizada a laminectomia e o grupo que recebe o aparato de troca de calor a 37 °C (normotérmico).

Yeo et al. (1975), estudando autópsias de pacientes que sofreram lesão medular, observam que, embora aparentemente intactos, os neurônios contundidos têm cessada sua função, o que, por meio de métodos químicos ou físicos, pode ser parcialmente revertido. Procuram diferenciar a concussão, a contusão e a laceração em medulas recentemente lesadas em ovelhas e tentam reproduzir a lesão contusiva experimental em animais e a

sequência dos eventos patológicos, bem como usar a mielografia com isótopos para definir o grau de lesão da medula espinal. Observam uma tendência similar nos padrões de recuperação sensitiva e motora, sugerindo que a isquemia e a hipóxia poderiam contribuir significativamente na patogênese da paraplegia pós-traumática.

Dohrmann et al. (1976a) descrevem um aparelho para produzir lesão experimental da medula espinal com monitoração do grau do traumatismo em relação à velocidade de deformação da medula espinal, ao impulso e à energia, podendo ser usado em diferentes tipos de animais com maior acurácia para se poder correlacionar a quantidade de lesão, o grau de disfunção neurológica e a eficácia dos vários métodos de tratamento. Esse aparelho consiste em um modelo de queda de peso com haste contida dentro de um tubo de plástico transparente. A orientação vertical do impacto era assegurada por meio de um nível colocado no topo do tubo. **Dohrmann et al. (1976b)** realizam estudo experimental de lesão da medula espinal em 15 gatos por queda de peso no nível T5–T6. Aplica-se um trauma de 400 g.cm, sendo os animais divididos em cinco grupos, 5 g x 80 cm; 10 g x 40 cm; 20 g x 20 cm; 40 g x 10 cm; e 80 g x 5 cm. Comparam os parâmetros biomecânicos e o volume de lesão entre os cinco grupos, observando que o volume de lesão é diferente em todos os grupos, embora todos tenham recebido a mesma lesão de 400 g.cm. A quantidade de energia transferida para a medula é dependente de vários fatores, como altura, velocidade e massa sobre a medula. Em comparação ao grupo 1, a energia absorvida pela medula é 100 vezes maior no grupo 4.

Kuchner e Hansebout (1976) avaliam cães com lesão experimental por compressão com balão extradural submetidos a tratamento isolado com dexametasona, hipotermia sem irrigação ou associação de dexametasona e hipotermia sem irrigação. A hipotermia é realizada por meio da colocação de uma bolsa de Silastic local com conteúdo fluido resfriado entre $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, não havendo a possibilidade de a irrigação contribuir para a recuperação funcional. Os resultados mostram que os grupos que recebem tratamentos isolados com dexametasona e hipotermia apresentam capacidade de deambulação, enquanto o grupo não tratado não pode caminhar. O grupo que recebe tratamento associado de hipotermia e dexametasona é o que apresenta melhor índice de recuperação motora final.

Yeo et al. (1976) realiza estudo prospectivo do uso de terapia com oxigênio hiperbárico para controlar o início de paraplegia depois de lesão medular espinal recente em ovelhas. Os relatos preliminares sugerem que a terapia com oxigênio hiperbárico

instituída dentro de duas horas após a lesão resulta em melhora da recuperação motora.

Yeo et al. (1976) estudam o grau de recuperação motora em ovelhas submetidas a uma contusão controlada da medula espinal torácica em comparação com a recuperação em ovelhas tratadas com oxigênio hiperbárico. Confirmam os resultados preliminares previamente publicados. O grau de necrose cística central da medula espinal e a degeneração ao redor da substância branca são comparados nos animais do grupo controle e de tratamento. A melhora na recuperação motora e o grau de degeneração medular depois do tratamento com oxigênio hiperbárico sugerem que a isquemia tem um papel significativo nos animais experimentados com uma lesão de contusão da medula espinal.

Holbach et al. (1977) estudam prospectivamente 15 pacientes, sendo 13 homens e duas mulheres entre 18 anos e 65 anos, com média de idade de 44 anos e com lesões compressivas da medula espinal. No pós-operatório, são incluídos aqueles pacientes em que o déficit neurológico pré-operatório permanece ou se agrava. A terapia é administrada diariamente por 10 a 15 sessões de 40 minutos cada, a uma pressão de 1,5 atm. Os critérios de avaliação baseiam-se em exames clínicos realizados imediatamente antes, durante e após as sessões de oxigênio hiperbárico, na avaliação por eletroneuromiografia (ENMG) e na avaliação da PO₂ arterial e do líquido cefalorraquidiano. Encontram melhora do déficit neurológico em seis dos 13 pacientes e aumento considerável da PO₂ arterial e do líquido cefalorraquidiano. Nos pacientes em que é realizada a ENMG, encontram aumento significativo na amplitude dos sinais, resultante do aumento do recrutamento dos neurônios motores. Concluem que o tratamento com oxigênio hiperbárico pode ser útil no tratamento das lesões compressivas da medula espinal, mas que estudos clínicos adicionais têm de ser realizados para demonstrar a eficácia dessa modalidade de tratamento.

Rivlin e Tator (1977) desenvolvem um novo método de avaliação clínica da função motora em ratos, que consiste em colocar o rato em plano inclinado. O método permite o ajuste da inclinação em vários graus e a verificação do plano do ângulo mínimo que o animal pode sustentar-se na posição, sem cair. Esse método é utilizado para quantificar a função motora em ratos normais (controle) e ratos sujeitos à mielectomia, demonstrando consistente diferença entre os dois grupos.

Yeo et al. (1977) estudam os resultados das mudanças patológicas associadas com a necrose central pós-traumática da medula espinal em ovelhas submetidas à lesão experimental pelo modelo de queda de peso. Os animais foram divididos em grupo

controle, isto é, sem tratamento algum a não ser os cuidados básicos, e grupo tratado com metilprednisolona intratecal, alfa-metil-paratirosina e oxigênio hiperbárico. Encontram, no grupo sem tratamento, intensa necrose da substância cinzenta central e microcistos e desmielinização ao redor da e na substância branca, com vários graus de fibrose, gliose e extensa degeneração cística central. Apesar do intenso grau de degeneração, havia recuperação motora significativa, com todos os animais desse grupo recuperando pelo menos os movimentos antigravitacionais. Nenhum animal do grupo controle ou dos grupos tratados obtêm recuperação motora total. No grupo dos animais tratados com metilprednisolona intratecal, o grau de degeneração cística central e desmielinização parecia idêntico ao do grupo não tratado. No grupo tratado com alfa-metil-paratirosina, há recuperação motora significativa, menor degeneração cística central e menos microcistos na substância branca. Nos animais tratados com oxigenoterapia hiperbárica, há melhora significativa da recuperação motora por um período de oito semanas depois da lesão, menor degeneração cística central e menor formação de microcistos nas colunas anterior e lateral. Na análise estatística, há melhora em todas as semanas, com exceção da quinta semana. A possível aplicação clínica da alfa-metil-paratirosina é impedida, pela sua toxicidade renal, em pacientes com lesão medular.

Balentine (1978) estuda a lesão necrótica da medula espinal em ratos adultos submetidos à lesão experimental pelo modelo de queda de peso por meio da análise da mudança patológica sequencial das alterações dos vasos sanguíneos e da necrose tecidual da medula espinal em períodos de tempo que variam de 3 minutos a 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, a 1 semana após a lesão. Esse estudo confirma a evolução sequencial do desenvolvimento de necrose, primeiro na substância cinzenta e depois na substância branca. A observação dos vasos sanguíneos demonstra que a necrose é devida à ruptura dos vasos sanguíneos, tanto artérias quanto veias principais, lesados durante o traumatismo.

Ducker et al. (1978) medem os níveis de oxigênio tecidual e o fluxo sanguíneo na medula de cães paraplégicos devido a traumatismo medular. Documentam que a lesão medular produz grande diminuição do fluxo sanguíneo. Sugerem que os esforços terapêuticos devem ter como objetivo melhorar a oxigenação e aumentar o fluxo sanguíneo para a medula.

Rivlin e Tator (1978) estudam prospectivamente o fluxo sanguíneo regional em 12 ratos Wistar pesando entre 350 g e 400 g, sendo o fluxo regional medido 5 minutos, 2

horas e 24 horas após a lesão. Utilizam a técnica radiográfica com C-antipirina para avaliação do fluxo sanguíneo. Concluem que lesões por compressão medular grave produzem grave isquemia pós-traumática na medula espinal por pelo menos 24 horas. Descrevem um novo modelo de lesão medular com a utilização de cliques de aneurisma modificados para compressão colocados ao redor da medula, extraduralmente.

Tator e Rowed (1979) salientam a importância da lesão medular secundária após o trauma inicial. Afirmam que raramente uma lesão medular causa transecção anatômica na medula, embora frequentemente cause paralisia completa ou incompleta da função medular. Descrevem que, inicialmente, pelo exame histológico da medula, são observados pontos hemorrágicos na substância cinzenta e edema na substância branca. Semanas após a lesão inicial, é observada a substituição do tecido medular necrótico por cavidades. Observam haver dois tipos de lesão vascular após o trauma medular. O primeiro é a lesão imediata de pequenos vasos medulares, especialmente vênulas da substância cinzenta, o que resulta em hemorragia poucos minutos após o trauma. O segundo tipo de lesão vascular é mais destrutivo, com isquemia grave e infarto das substâncias branca e cinzenta. Acreditam na hipótese de que o tratamento deve ser direcionado para a fase aguda, a fim de impedir o infarto secundário e melhorar a recuperação. Citam os corticosteroides como drogas a serem utilizadas para impedir a cascata secundária de lesões após o trauma medular agudo.

Gamache et al. (1981) avaliam prospectivamente 25 pacientes com lesão aguda da medula espinal por um período de 18 meses, sendo estes submetidos à terapia com oxigênio hiperbárico aproximadamente sete horas e trinta minutos após a lesão. Todos os pacientes de ambos os grupos receberam metilprednisolona. São comparados os escores motores pré e pós-tratamento. Observam que, apesar de apresentarem os mesmos escores motores ao final da avaliação em quatro meses e um ano em relação aos que recebem terapia tradicional (realinhamento ósseo com ou sem estabilização cirúrgica), o grupo submetido à oxigenoterapia hiperbárica obteve uma velocidade de recuperação mais rápida. Concluem que existe, portanto, evidência de que o tratamento com oxigênio hiperbárico altera o tempo de recuperação sem alterar o resultado final.

Lohse et al. (1980) realizam estudo experimental em 24 gatos que são submetidos à lesão medular na coluna torácica ao nível de T5 aplicando forças de 100 g.cm ou 260 g.cm.

Observam, após o trauma, aumento da pressão sanguínea (137%) e arritmia

cardíaca em todos os grupos. Demonstram que, no grupo com trauma de 100 g.cm, não foi observado diferença significativa quanto ao fluxo sanguíneo, enquanto no grupo com trauma de 260 g.cm houve aumento do fluxo sanguíneo nas seis horas posteriores ao trauma. Concluem não existir isquemia da substância branca nas lesões medulares e que, assim, a paraplegia resultante deve ser transitória. Esses dados corroboram o conceito de que a isquemia da substância branca, na fase aguda de um trauma medular grave, deve estar relacionada à lesão secundária e, subsequentemente, à paraplegia permanente.

Means et al. (1981) comprovam, em estudo experimental de lesão medular aguda em gatos, que a metilprednisolona apresenta efeitos benéficos quanto à recuperação motora. Avaliam parâmetros morfométricos da medula lesada, a porcentagem de área cavitária e a porcentagem ocupada pela cavidade na medula, comparando estes parâmetros com a avaliação da recuperação neurológica dos animais. Observam uma correlação negativa entre o tamanho da cavidade e o índice de recuperação motora.

De La Torre (1981), em artigo de revisão sobre as estratégias de pesquisa básica e aplicada sobre lesão medular, analisa os modelos experimentais, as técnicas de avaliação do trauma medular experimental, os estudos neurofisiológicos e morfológicos, o mecanismo vascular, o fluxo sanguíneo medular, as mudanças bioquímicas e metabólicas e o tratamento da lesão medular aguda e crônica. Na lesão crônica, destaca três possíveis caminhos de regeneração axonal no SNC: 1 – brotamento colateral, 2 – plasticidade e 3 – regeneração axonal. Refere que a regeneração pode ser conseguida por transplante de tecido neural (células fetais) e pelo uso de fatores de crescimento. Cita a existência de evidências de sobrevivência e crescimento dessas células.

Young et al. (1981) estudam, prospectivamente, os efeitos da naloxona em 25 gatos adultos submetidos à lesão traumática da medula espinal em modelos de impacto por queda de peso. Estudam o fluxo sanguíneo da medula espinal por depuração de hidrogênio, observando melhora do fluxo sanguíneo no grupo tratado com naloxona em comparação com o grupo controle, sem tratamento, e com o grupo que recebe solução salina. Observam também a preservação da função sensitiva e o potencial evocado somato-sensitivo registrados por eletrodos bipolares no espaço epidural 24 horas pós-lesão no grupo tratado com naloxona.

Anderson et al. (1982) realizam um estudo prospectivo em gatos adultos fêmeas com lesão medular produzida divididos em três grupos. O primeiro grupo não recebe tratamento; o segundo, é tratado com altas doses de metilprednisolona (15 mg/kg/24 h);

e o terceiro, é tratado com megadose de metilprednisolona (60 mg/kg/24 h). Avaliam a microvascularização no sítio da lesão por método indireto, com o uso de carbono coloidal. Observam que o grupo tratado com altas doses de metilprednisolona apresenta preservação substancial da perfusão microvascular quando comparado com o grupo não tratado.

Young e Flamm (1982) relatam estudo prospectivo com 15 gatos adultos submetidos à lesão traumática pelo modelo de contusão de impacto por queda de peso de 400 g.cm. Os animais foram divididos em três grupos: 1º grupo, sem tratamento; 2º grupo, que recebe a dose de 15 mg/kg de succinato sódico de metilprednisolona 45 minutos após a lesão; e 3º grupo, que recebe a dose de 30 mg/kg de succinato sódico de metilprednisolona. Observam que, no grupo tratado com altas doses de metilprednisolona (30 mg/kg), ocorre melhora do fluxo sanguíneo na primeira hora após a lesão, medido pela depuração de hidrogênio. Há melhora da concentração de cálcio extracelular e do potencial evocado somato-sensitivo ativado pela estimulação do nervo ciático e registrado bipolarmente por eletrodos colocados no espaço epidural sobre o córtex somato-sensitivo. Esses dados sugerem que o tratamento com altas doses de corticosteroide causa dilatação dos vasos sanguíneos da medula espinal. O consequente aumento do fluxo sanguíneo pode explicar os efeitos benéficos das altas doses de corticosteroide na recuperação funcional.

Braugher e Hall (1983) publicam estudo de lesão medular em 87 gatos submetidos à laminectomia de L2 a L5. Aplicam uma carga compressiva de 400 g.cm para produzir lesão medular. Alguns animais recebem uma dose única de succinato de metilprednisolona, que varia de 7,5 mg/kg a 60 mg/kg, em bolo, 30 minutos após a lesão. Relatam que a lesão produz uma rápida elevação do lactato, duas vezes maior após cinco minutos e três vezes maior após duas horas, sendo que seu valor declina após quatro e oito horas da lesão. O piruvato diminui na primeira hora após a lesão, mas sua concentração aumenta entre duas e oito horas depois. Sugerem que o uso do corticoide pode melhorar o fluxo sanguíneo nas lesões medulares.

Ford (1983) modifica o método de lesão medular descrito por **Allen (1911)** e realiza lesão medular em 33 gatos. Avalia a recuperação funcional dos membros inferiores e observa os achados histológicos da medula lesada após seis semanas do traumatismo medular. Comprova que as modificações realizadas no método de **Allen (1911)** são efetivas para causar lesão medular e que este método reduz as variáveis.

Revela que a metodologia utilizada para avaliar a recuperação motora não satisfaz as necessidades de uma avaliação completa e detalhada.

Hall et al. (1984) estudam o fluxo sanguíneo medular em 25 gatos adultos submetidos à contusão medular padronizada ao nível de L3. Após a lesão, realizam estudo do fluxo sanguíneo em todos os gatos 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas após a lesão. Esses animais são divididos em quatro grupos, o primeiro sendo o grupo controle; o segundo, recebendo 15 mg/kg de metilprednisolona; o terceiro, recebendo 30 mg/kg de metilprednisolona; e o quarto, recebendo 60 mg/kg de metilprednisolona. Demonstram que os gatos que recebem 30 mg/kg mantêm o fluxo sanguíneo dentro da normalidade; os que recebem 15 mg/kg apresentam benefícios menores; e aqueles que recebem 60 mg/kg não têm nenhum benefício. Concluem que o corticoide diminui a isquemia medular pós-traumática quando administrado na dose de 30 mg/kg dentro das primeiras horas após o trauma, mas não reverte a isquemia quando esta já ocorreu.

Anderson et al. (1985) descrevem uma série de eventos fisiopatológicos que ocorrem no tecido medular lesado, subsequentes ao TRM agudo, que acarretam destruição tecidual e paraplegia. Citam, como evento secundário ao trauma medular agudo, necrose hemorrágica, isquemia, edema, inflamação, perda de cálcio no espaço extracelular e perda de potássio no espaço intracelular. Lembram a importância da peroxidação lipídica, que pode lesar, direta e indiretamente, as células. Afirmam que a metilprednisolona, em estudos experimentais de lesão medular em animais, tem sido efetiva na prevenção da ocorrência dessa cascata de eventos secundários que leva à lesão medular, atenuando a ação de radicais livres de oxigênio na peroxidação lipídica.

Bracken et al. (1985) publicam um estudo multicêntrico da eficácia do uso de altas doses de metilprednisolona (1.000 mg em bolo e diariamente por 10 dias) comparado com o uso da dose padronizada (100 mg em bolo e diariamente por 10 dias). Relatam não haver diferença significativa entre os grupos em relação à recuperação motora em um prazo de seis semanas a seis meses após a lesão. Observam que houve maior índice de infecção no trato cirúrgico e maior mortalidade no grupo que recebeu altas doses, mas ressaltam que estes dados não foram estatisticamente significativos.

Gale et al. (1985) realizam um estudo de análise comportamental em ratos submetidos à lesão por contusão da medula espinal. Com base nessas análises, desenvolvem um protocolo para avaliação do déficit funcional. Esse protocolo é

administrado por pessoas treinadas e consiste em uma contagem comportamental combinada de vários testes em que o componente principal da avaliação comportamental é a escala motora, que envolve uma avaliação passiva das patas traseiras (membros posteriores) dos animais e é uma versão modificada da escala descrita por Tarlov. Os animais são observados em campo aberto, sendo cada membro traseiro observado individualmente e graduado em: 0 – nenhum movimento das patas traseiras e nem suporte de peso; 1 – movimento fracamente perceptível dos membros traseiros, mas sem suporte de peso; 2 – movimentos frequentes e/ou vigorosos nos membros traseiros, mas sem suporte de peso; 3 – suporte de peso nos membros traseiros, podendo trocar um ou dois passos; 4 – caminhar com déficit leve; e 5 – caminhar normal.

Noble e Wrathall (1985) estudam as alterações morfométricas da medula espinal em 51 ratos Sprague-Dawley submetidos à lesão medular experimental pela técnica de queda de peso de 10 g das alturas de 2,5 cm, 5,0 cm, 7,5 cm, 10 cm e 17,5 cm. Quatro semanas após a lesão, o volume, a extensão e as dimensões do tecido no epicentro da lesão (área da lesão, área da substância branca e área da substância cinzenta) são medidos e correlacionados com a altura da queda do peso e os resultados do déficit comportamental, motor e sensitivo. Concluem que a técnica de queda de peso pode ser usada em ratos para produzir lesões leves, moderadas e graves, sendo, portanto, uma técnica apropriada para prover estudos em modelos de ratos com foco na lesão contusa da medula espinal.

Albin e White (1987) demonstram que o traumatismo da medula espinal, além da destruição mecânica, desencadeia hemorragia, diminuição da perfusão, hipóxia tecidual, edema e, finalmente, necrose dos elementos neurais.

Bresnahan et al. (1987) desenvolvem um aparelho de impacção com função eletromecânica. Afirmam que a lesão medular experimental reprodutível depende de uma resposta imediata das propriedades mecânicas do impacto. Documentam que o aparelho apresentado é sensível às características do tecido lesado e permite manipulação contínua da força de impacto ou do deslocamento tecidual. Descrevem os resultados anatômicos e comportamentais de um determinado índice de impacto e examinam a capacidade do aparelho em produzir uma lesão traumática consistente.

Janssen e Hansebout (1989), em revisão da literatura, analisam a patogênese da lesão da medula espinal e os novos tratamentos químicos e físicos que podem diminuir o dano secundário, encontrando que a terapia com oxigênio hiperbárico tem demonstrado

resultados positivos. A razão pela qual é explicada essa abordagem é que a diminuição da perfusão tecidual pode ser compensada pelo aumento dos níveis de oxigênio no sangue. Concluem que, nos casos em que ocorre cessação completa da circulação na área medular lesada, esse tratamento pode não ser efetivo.

Noble e Wrathall (1987) descrevem um modelo de aparelho para provocar lesão experimental por contusão da medula espinal em ratos utilizando a queda de peso. Utilizam pinças para fixar os processos espinhosos adjacentes e, com essas modificações, diminuem as variáveis que podem produzir lesões assimétricas, sendo a energia de impacto direcionada mais para a medula espinal, com diminuição do efeito amortecedor da caixa torácica, da coluna vertebral e dos movimentos respiratórios. Esse é um dos modelos mais utilizados atualmente.

Barros Filho et al. (1990), em estudo retrospectivo, analisam 428 casos de TRM no período de 1982 a 1987, encontrando como etiologias mais frequentes os ferimentos por arma de fogo (36,7%), acidentes em água rasa (7,7%), queda de objeto sobre o paciente (4,2%) e outras causas (2,3%). Chama atenção o fato de que, nesse estudo, 28% dos pacientes são atendidos nas primeiras seis horas após o acidente, 33,3% são atendidos no hospital um dia após o acidente e 3,3% são atendidos no hospital 15 dias ou mais depois do acidente.

Goldberger et al. (1990) propõem critérios para avaliação da recuperação da função da lesão da medula espinal por métodos comportamentais. Discutem a necessidade de reconhecimento das capacidades comportamentais específicas não conhecidas durante a recuperação neurológica e que, na maioria dos casos, não há distinção entre a recuperação das funções inicialmente perdidas e o uso de mecanismos de compensação. Sugerem e acreditam em métodos pelos quais se possa analisar a natureza particular do déficit comportamental e definir qual capacidade comportamental retorna e qual falha em se recuperar. A melhora da análise comportamental leva a hipóteses sobre os mecanismos de recuperação da função.

Geisler et al. (1991) realizam estudo prospectivo, randomizado e duplo-cego com monosialogangliosídeo sódico (GM1) em 37 pacientes com lesão medular. Desses, 34 completam o experimento. Os pacientes iniciam o tratamento nas primeiras 72 horas após a lesão e passam a receber, diariamente, 100 mg de GM1 por um período de 18 dias a 32 dias. São avaliados pelas escalas de Frankel e da American Spine Injury Association (ASIA). Observam, nesse estudo, evidências de que o GM1 aumenta a recuperação da

função neurológica após um ano. Sugerem que um grande estudo deve ser conduzido antes de se considerar eficaz e seguro o tratamento da lesão medular com GM1.

Tator e Fehlings (1991) procuram comprovar, por meio de estudos microangiográficos, a lesão isquêmica secundária com o uso de angiograma de carbono coloidal com vários modelos de lesão medular experimental, na tentativa de simular o trauma medular agudo tipo compressão: modelo de queda de peso, tração e grampo de compressão extradural. Concluem que existem fortes evidências de que a isquemia pós-traumática é um importante mecanismo de lesão secundária e que esses efeitos vasculares podem ser tratados.

Behrmann et al. (1992) apresentam um aparelho para produzir contusão medular em ratos que são comparados com um outro grupo, que foi submetido à secção anatômica da medula. Realizam análise histológica e comportamental da recuperação locomotora pela modificação da escala de Tarlov. Observam a marcha dos animais em campo aberto, em plano inclinado e em grade. Demonstram haver recuperação funcional nos animais que sofreram contusão medular quando comparados com o grupo que foi submetido à secção.

Bracken et al. (1992), em estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego e multicêntrico em pacientes com lesão medular aguda, observam que os pacientes que recebem metilprednisolona dentro de oito horas após a lesão, na dose de 30 mg/kg em bolo na primeira hora e 5,4 mg/kg/h por 23 horas, apresentam melhora da função neurológica nas primeiras seis semanas e no sexto mês. O grupo tratado com naloxona (5,4 mg/kg em bolo na primeira hora e 4,0 mg/kg/h por 23 horas) não apresenta recuperação significativamente maior. Os pacientes tratados após oito horas, recebendo metilprednisolona ou naloxona, apresentam menor recuperação da função motora quando comparados ao grupo placebo. Concluem que o tratamento com a dose utilizada de metilprednisolona é indicado para o trauma agudo da medula espinal, mas somente se iniciado dentro de oito horas da lesão.

Hall (1992) relata que um regime intensivo de metilprednisolona em altas doses dentro de oito horas após o traumatismo medular tem melhorado a recuperação funcional de pacientes e de animais de laboratório. Ressalta que a ação neuroprotetora da metilprednisolona envolve a capacidade de inibir os radicais livres de oxigênio induzidos pela peroxidação lipídica e discute a possibilidade de novas drogas ou uma associação de drogas diminuir os efeitos colaterais do uso de altas doses de metilprednisolona.

Nockels e Young (1992), em artigo sobre estratégias farmacológicas no tratamento experimental da lesão medular espinal aguda e crônica, relatam que, na fase crônica, a mielina possui fatores de inibição da regeneração axonal. O bloqueio desses fatores aumenta a regeneração da medula espinal, constituindo-se em nova possibilidade terapêutica.

Basso et al. (1993), em nota publicada na Sociedade de Neurociência, afirmam que existe recuperação incompleta da função motora em ratos. Sugerem que grandes lesões do SNC resultam em recuperação incompleta da coordenação com concomitante perda dos neurônios vestibuloespinhais e proprioceptivos.

Bracken e Holford (1993) publicam artigo em que apresentam os resultados observados pela National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS). Relatam que o NASCIS 1 (1977) conduziu estudo randomizado e controlado das terapias que podem melhorar a lesão medular e o NASCIS 2 comparou o uso de altas doses de metilprednisolona ou naloxona ao placebo, reportando que pacientes que iniciaram tratamento dentro das primeiras oito horas tiveram melhora significativa da função motora em seis semanas, seis meses e um ano após a lesão.

Afirmam que a metilprednisolona, aplicada precocemente após lesão medular, melhorou a função motora de pacientes diagnosticados inicialmente com lesão completa ou incompleta. Destacam que o tratamento tardio com metilprednisolona está associado à diminuição da recuperação neurológica. Concluem que essa análise ampara o uso de metilprednisolona em altas doses para o tratamento das lesões medulares no TRM.

Walker e Harris (1993) publicam estudo randomizado e duplo cego em humanos que apresentavam lesão medular crônica. Observam que aqueles que foram tratados com o gangliosídeo GM1 mostraram melhora funcional em relação àqueles que receberam placebo. Afirmam que o GM1 é uma opção terapêutica no tratamento desses pacientes.

Constantini e Young (1994) estudam os efeitos do tratamento com metilprednisolona e gangliosídeo GM1 e da associação de metilprednisolona e gangliosídeo GM1 em modelos experimentais de lesão medular por queda de peso em ratos. O peso utilizado é de 10 g e as alturas, de 12,5 mm, 25 mm e 50 mm, ao nível de T10. A metilprednisolona administrada em dose única de 30 mg/kg cinco minutos após a lesão teve efeito significativo em reduzir o volume da lesão e impedir a hiponatremia induzida pela lesão. O GM1 administrado isoladamente na dose de 10 mg/kg a 30 mg/kg teve pouco ou nenhum efeito em quaisquer das variáveis medidas. A associação de

metilprednisolona e GM1 bloqueia os efeitos da metilprednisolona. Concluem, portanto, que o GM1 antagoniza com os efeitos, central e periférico, da metilprednisolona em ratos com lesão medular e recomendam que ambos não sejam usados concomitantemente para tratar lesão medular aguda em humanos até que essa interação seja mais bem conhecida.

Basso et al. (1995) verificam o comportamento depois da lesão medular contusa em ratos fazendo uma modificação da escala locomotora desenvolvida por **Tarlov et al. (1953)**. Os dados obtidos indicam que a escala é válida e é uma medida preditiva da recuperação motora, sendo capaz de distinguir resultados comportamentais causados pelas diferentes lesões e de predizer alterações anatômicas no centro da lesão. Os testes inter-ratos indicam que examinadores com experiência no seu uso conseguem aplicá-la consistentemente e obter resultados similares. A escala BBB oferece aos avaliadores uma medida mais discriminatória dos resultados comportamentais para avaliar o tratamento depois da lesão da medula espinal.

Basso et al. (1996) padronizam um aparelho desenvolvido pela New York University (NYU) para realizar lesão medular contusa em ratos. Citam o teste BBB como sendo mais sensível que os demais até então descritos para avaliar a recuperação da função locomotora em ratos que sofreram lesão medular contusa. Demonstram que o sistema da NYU permite produzir uma contusão medular graduada, consistente e reproduzível em todos os ratos. Afirmam que um exame dos efeitos terapêuticos para índices lentos e rápidos de recuperação é mais evidente nos grupos graduados com 12,5 mm e 25 mm de altura da queda do peso de 10 g sobre a medula. Confirmam que uma maior quantidade de tecido poupado está diretamente relacionada com uma melhor função locomotora final quando aplicada a escala BBB.

Documentam aumento dos movimentos dos membros inferiores em duas semanas após lesão compressiva ou por transecção medular e concluem que a escala BBB é aplicável, após a utilização do sistema da NYU, na análise da recuperação da função locomotora em ratos com lesão medular contusa.

Chen et al. (1996) investigam se a regeneração axonal em enxertos de CS é aumentada quando a metilprednisolona é administrada no momento da transecção medular e da implantação de CS. Os resultados desse estudo evidenciam que a metilprednisolona melhora a regeneração axonal na medula com enxerto de CS.

Schwab e Bartholdi (1996) realizam estudo de revisão dos conhecimentos dos mecanismos envolvidos na degeneração e regeneração axonal após lesão da medula

espinal, particularmente, em mamíferos e humanos. Concluem que as pesquisas voltadas ao tratamento das lesões primária e secundária podem, no futuro, levar a uma alta porcentagem de lesões incompletas, possibilitando melhores condições de reabilitação. Portanto, a redução do dano secundário associada com a otimização do uso das conexões remanescentes, o aumento da plasticidade e a regeneração a longa distância dos axônios lesados é o ideal a ser obtido no futuro.

Bracken et al. (1997), em ensaio clínico randomizado, duplo-cego e multicêntrico em 499 pacientes com lesão medular aguda diagnosticada dentro das primeiras oito horas da lesão, comparam a eficácia da metilprednisolona, administrada por 24 horas e 48 horas, e do mesilato de tirilazade, administrado por 48 horas. Concluem que pacientes com lesão medular aguda que recebem metilprednisolona nas primeiras três horas devem manter o tratamento por 24 horas, enquanto, naqueles que iniciam o tratamento entre três e oito horas após o trauma, a metilprednisolona deve ser mantida por 48 horas. Os pacientes que são tratados com mesilato de tirilazade têm taxas de recuperação motora equivalentes às taxas daqueles que recebem metilprednisolona por 24 horas.

Bregman et al. (1997) realizam estudo experimental em ratos adultos submetidos à hemissecção medular nos níveis cervical e torácico, transplantados com tecido medular espinal fetal e que tiveram fatores neurotróficos injetados no sítio da lesão. Observam, nesse estudo, um claro aumento das interações entre as células hospedeiras do SNC e o tecido medular fetal transplantado. Os fatores neurotróficos podem influenciar o tropismo dos neurônios maduros do SNC, aumentando a extensão do crescimento axonal das células transplantadas e a densidade destas (número e ramificações das fibras), levando, em alguns aspectos, à melhora da função locomotora.

Gebrin et al. (1997a) revisam as pesquisas existentes sobre drogas para tratamento da lesão medular aguda e descrevem as principais substâncias endógenas que participam do dano medular secundário e as drogas, em estudo, para combater este efeito. Indicam a metilprednisolona como droga com efeitos positivos comprovados e citam as pesquisas promissoras com aminoesteroides. Encerram o artigo ressaltando a grande importância e contribuição dos estudos multicêntricos NASCIS 1, 2 e 3, desenvolvidos na América do Norte.

Gebrin et al. (1997b) publicam artigo de revisão da literatura discutindo as perspectivas de recuperação do paciente lesado medular. Chamam atenção para o fato de que o SNC adulto não apresenta a mesma capacidade de regeneração que os nervos

periféricos. Descrevem os resultados do NASCIS, apontando a metilprednisolona como droga que melhora a função neurológica, e citam o GM1 como uma substância eficiente na recuperação de pacientes com lesões crônicas do SNC. Concluem afirmando que trabalhos experimentais demonstram que axônios íntegros, mesmo que poucos, podem propiciar integridade de arco reflexos viscerais, como vesical, sexual e intestinal, e que 10% de axônios remanescentes podem oferecer condições de marcha para o paciente.

Bracken et al. (1998) realizam ensaio clínico randomizado duplo-cego com o intuito de comparar a recuperação funcional e neurológica e as taxas de morbidade e mortalidade um ano após a lesão medular aguda em pacientes que recebem metilprednisolona por 24 horas ou por 48 horas ou mesilato de tirilazade por 48 horas. Observam recuperação neurológica similar nos três grupos de pacientes que recebem o tratamento dentro das primeiras três horas da lesão. Nos pacientes que recebem tratamento após três horas da lesão, o grupo que recebe metilprednisolona por 24 horas apresenta menor recuperação da função motora, e os que recebem metilprednisolona por 48 horas apresentam maior recuperação da função motora em um ano. O grupo que recebe mesilato de tirilazade teve recuperação semelhante à daqueles que recebem metilprednisolona por 24 horas. As taxas de mortalidade e morbidade são iguais nos três grupos. Concluem que, nos pacientes que iniciam o tratamento dentro das primeiras três horas, a manutenção do tratamento por 24 horas é apropriada. Nos pacientes que iniciam a terapia três a oito horas após a lesão, o regime de tratamento deve ser mantido por 48 horas, a menos que haja contraindicações clínicas.

Ramón-Cueto et al. (1998) estudam o transplante de células olfatórias gliais em ratos adultos submetidos à secção medular. Observaram que as células olfatórias, transplantadas por meio de pontes de CS, atravessam a fibrose glial e migram longitudinalmente e lateralmente na distância máxima de 1,5 cm através das substâncias branca e cinzenta. Crescimento à longa distância, de pelo menos 2,5 cm, ocorre na porção rostral da medula espinal. Concluem que essa forma de estudo criará novas possibilidades para o tratamento das lesões do SNC que requeiram regeneração axonal.

Amar e Levy (1999) revisam a patogênese e estratégias farmacológicas para atenuar o dano secundário na lesão medular aguda. Por meio de observações em modelos experimentais e clínicos, acreditam que os conceitos de lesão primária e secundária estão bem estabelecidos e têm amplas implicações no tratamento da lesão medular aguda. Avaliam os efeitos de vários agentes farmacológicos, entre eles, dos glicocorticoides,

gangliosídeos, antagonistas dos opioides, bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas dos receptores do glutamato, agentes antioxidantes, radicais livres e outros agentes farmacológicos, em experimentos em modelos animais e humanos. Concluem que, dentro de um espaço de tempo limitado, esses agentes podem ser úteis, e enfatizam que, futuramente, é provável que a terapia envolva a combinação de vários desses agentes.

Delamarter e Coyle (1999) relatam que o NASCIS 3 concluiu que a metilprednisolona melhora a recuperação neurológica após lesão medular aguda e recomendam que os pacientes que recebem metilprednisolona dentro de três horas da lesão inicial devem ser mantidos em regime de tratamento por 24 horas. Quando a terapia é iniciada entre três e oito horas após a lesão, o tratamento deve ser mantido por 48 horas. Adotam, como conduta, o uso da metilprednisolona e a imediata redução e estabilização da lesão que causa compressão medular.

Jeffery e Blakemore (1999) afirmam que, até o momento, apenas a cirurgia descompressiva e o uso de metilprednisolona têm se mostrado eficazes no tratamento do traumatismo medular agudo.

Rodrigues (1999) padroniza um modelo de lesão de medula espinal em ratos Wistar e utiliza equipamento computadorizado para impacto por queda de peso, de acordo com parâmetros determinados pelo *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study* (MASCIS). Verifica a existência de correlação estatisticamente significativa entre o volume de lesão e os parâmetros mecânicos. Conclui que o modelo é capaz de gerar lesões medulares padronizadas em ratos.

Vialle et al. (1999), em estudo experimental de lesão medular em ratos Long-Evans utilizando o modelo de queda de peso com o NYU Impactor, avaliam a histologia da lesão da medula espinal dos ratos sacrificados a cada seis horas até 48 horas após a lesão. Utilizam a coloração com hematoxilina-eosina (HE). Observam, nos ratos sacrificados, em seis horas, uma redução volumétrica dos neurônios; em 24 horas pós-lesão, redução no número de neurônios e indícios de vacuolização; e, em 48 horas, intensa degeneração neuronal e vacuolização.

Yoon et al. (1999) comprovam que, em lesão medular produzida pelo sistema NYU Impactor, uma dose única de 30 mg/kg de metilprednisolona, aplicada 10 minutos após o traumatismo medular, reduz significativamente o volume de lesão em 24 horas quando comparado com o grupo controle. Afirmam que, no modelo de lesão medular produzido pelo sistema da NYU, existe uma janela terapêutica muito curta.

Bracken (2000) apresenta uma revisão randomizada dos agentes farmacológicos para o tratamento da lesão medular aguda. Conclui, nessa revisão, que altas doses de metilprednisolona é a única terapia farmacológica que mostra ter eficácia no tratamento da lesão medular aguda.

Debrovner (2000) publica artigo em meio eletrônico sobre o uso de CT, células primitivas capazes de formar muitos tipos diferentes de células do corpo, como chave para a cura de doenças fatais ou crônicas. Define os diferentes tipos de células, sítios e o momento da evolução nos quais são encontradas, bem como suas características, seus processos de especialização e de crescimento tecidual e possíveis aplicações: CT, totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Aborda aspectos éticos, morais e religiosos, riscos e controvérsias. Refere-se a algumas recomendações da *American Association for the Advancement of Science* e do *Institute for Civil Liberty* quanto ao uso dessa tecnologia. Chama atenção quanto a possíveis riscos de criação de expectativas miraculosas e dilemas morais.

Short et al. (2000) realizam revisão sistemática da literatura utilizando critérios de inclusão, exclusão e validade pré-definidos. Fica evidente, nessa revisão sistemática, não haver suporte para o uso de altas doses de metilprednisolona na lesão medular aguda a fim de melhorar a recuperação neurológica.

Blight e Zimber (2001) chamam atenção para o fato de não haver drogas específicas que ajam diretamente na lesão medular. Discutem a importância de drogas que possam evitar a cascata de efeitos secundários após o traumatismo medular e ressaltam a importância da metilprednisolona como droga de escolha.

Bracken (2001) utiliza o método de medicina baseada em evidências para verificar a eficácia do uso de metilprednisolona no traumatismo medular agudo. Com base em evidências, conclui que a metilprednisolona, quando utilizada até oito horas após lesão medular aguda, é uma terapia segura e efetiva, podendo resultar em importante recuperação funcional clínica em alguns pacientes. Sugere que novos estudos com outras drogas ou drogas de uso concomitante com a metilprednisolona devem ser estimulados.

Geisler et al. (2001) publicam estudo clínico multicêntrico, randomizado, duplo cego e sequencial de duas doses do GM1, comparado com placebo, para determinar a eficácia desta droga na lesão medular aguda. Ressaltam que, embora não provem a eficácia primária do GM1 nessa análise, parece haver benefícios em seu uso em pacientes com lesão medular grave.

Hall (2001) demonstra que a maioria das lesões medulares não são lesões completas e que parte da substância branca permanece íntegra. Salienta que a recuperação neurológica depende da preservação das estruturas que permaneceram íntegras após o traumatismo, principalmente axônios descendentes e ascendentes da substância branca e de sua mielinização normal. Discute que as estratégias farmacológicas enfocam o controle do processo de lesão secundária, primariamente, a peroxidação lipídica e a manutenção do máximo de substância branca remanescente possível. Afirma que a metilprednisolona é a única droga que, em altas doses, melhora a função neurológica em animais.

Hurlbert (2001) revisa a literatura com métodos de medicina baseada em evidência para avaliar o uso de metilprednisolona na lesão medular aguda. Seus resultados mostram que a metilprednisolona não deve ser recomendada como um uso rotineiro na lesão medular aguda não penetrante. Conclui que o uso prolongado pode ser de risco para o paciente e considera a metilprednisolona uma droga sob investigação.

Legos et al. (2001) estudam os efeitos da metilprednisolona e da solução salina nos resultados funcionais e de fluxo sanguíneo após lesão da medula. Mostram que a solução salina pode aumentar a liberação de metilprednisolona e prevenir imunossupressão, levando à melhora da função neurológica e elevando os índices de sobrevivência após a lesão medular.

Taoka et al. (2001) salientam a importância dos eventos secundários ao traumatismo medular, como eventos vasculares progressivos e dano celular endotelial. Enfatizam que poucos agentes farmacológicos possuem ação no SNC lesado e destacam a ação da metilprednisolona e do GM-1, dizendo serem estas as únicas duas drogas que estão disponíveis para o uso clínico.

Cristante et al. (2002), em estudo prospectivo experimental com 20 ratos adultos submetidos à lesão raquimedular, transplantam células do sistema nervoso fetal para o sítio da lesão em 15 destes ratos. Cinco animais permanecem como grupo controle, sem transplante. Os ratos são sacrificados após 48 horas e submetidos a exame histológico. Encontram que, em 60% dos casos, as células fetais transplantadas permanecem viáveis e observam que a reação inflamatória é maior do que no grupo controle.

Merola et al. (2002) publicam estudo da resposta histológica da medula de ratos que foram submetidos à lesão medular contusa. Demonstram que, histologicamente, a metilprednisolona reduz o desenvolvimento de edema grave e preserva a arquitetura da medula adjacente ao local da lesão, mas, em contraste, a metilprednisolona não altera o

desenvolvimento de necrose medular ou a resposta astrocítica na zona de lesão.

Galvão (2003) avaliou a eficácia da aplicação da oxigenoterapia hiperbárica em ratos Wistar com lesão medular contusa produzida por equipamento computadorizado para impacto por queda de peso, o NYU Impactor. Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupo controle e grupo oxigênio hiperbárico. Observou melhora na recuperação locomotora dos ratos tratados com oxigênio hiperbárico nas fases iniciais de avaliação, mas, no final da avaliação, não havia diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos. O exame anatomopatológico comprovou as alterações estruturais da medula espinal nos dois grupos.

Marcon (2006), em estudo experimental de lesão medular em ratos Wistar utilizando o modelo de queda de peso com o NYU Impactor e a escala de avaliação funcional BBB, estuda os possíveis efeitos benéficos da utilização da metilprednisolona previamente ao TRM como forma de prevenir prováveis lesões associadas a algumas intervenções cirúrgicas. Não só não observa nenhum efeito benéfico da utilização prévia ao TRM como descreve possíveis complicações associadas.

Cristante et al. (2009a), em estudo experimental de lesão medular em ratos Wistar utilizando o modelo de queda de peso com NYU Impactor, a escala de avaliação funcional BBB e avaliação anatomopatológica, mostram possíveis efeitos benéficos da utilização da combinação das vitaminas C e E nas análises anatomopatológicas, por provável efeito antioxidante e menor resposta inflamatória, apesar desta diferença não se refletir em uma melhora funcional.

Hita (2008) estudou os efeitos do fator neurotrófico, proteína que auxilia na maturação e no desenvolvimento do sistema nervoso, no traumatismo medular. Conduziu testes que propiciaram a análise dos efeitos de recuperação funcional locomotora e regeneração axonal em ratos submetidos a testes experimentais com a utilização da substância neurotropina-4. Concluiu que a neurotropina-4 promove a recuperação locomotora funcional e diminui os efeitos secundários da lesão medular comparativamente ao grupo controle.

Cristante et al. (2009b) avaliam o efeito da infusão de CT indiferenciadas autógenas no sítio de lesão, por meio de arteriografia, em pacientes com lesão medular crônica (mais de dois anos). Em avaliação com potencial evocado somato-sensitivo, observou-se que 66,7% dos pacientes apresentaram melhora em dois anos e meio de seguimento.

Yao et al. (2016) conduz estudo relacionado ao transplante de CT e seu enorme potencial para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Parkinson. Hastes mesenquimais (MSCs) têm atraído muita atenção porque podem secretar uma ampla variedade de fatores celulares que promovem o crescimento celular. Nesse estudo, é preparado um meio condicionado (CM) usando meio de cultura MSC liofilizado que continha o secretoma de MSCs, aplicando-se este CM para a cultura de CTN (CM-CTN) para o transplante de ratos modelo PD. Exame de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativo em tempo real, Western blot e imunocitoquímica foram usados para identificar a diferenciação celular e expressão de genes específicos de neurônios dopaminérgicos *in vitro*. Testes comportamentais, incluindo comportamento rotacional e testes de treinamento por mobilização com movimento (MWM), também foram realizados para avaliar a recuperação. Nossos resultados indicaram que o tratamento combinado de CM e transplante de CTN pode reduzir significativamente a assimetria rotacional e melhorar a capacidade de aprendizagem espacial. Os CM-CTN foram capazes de se diferenciar em neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral e no feixe prosencefálico medial, migrando ao redor do local da lesão. Eles mostraram uma atividade maior do que as CTN não tratadas na sobrevivência celular e migração, bem como melhora do comportamento no modelo de rato com déficit de dopamina. Esses achados sugerem que as CTN tratadas com CM possuem um grande potencial como candidatas a enxerto para o tratamento da doença de Parkinson.

Nudi et al. (2015) mostraram que sistemas neurais embrionários e progesterona melhoram os resultados funcionais após TCE e, além disso, vários investigadores sugeriram que uma abordagem politerapêutica pode ter maior eficácia do que uma única terapia. O propósito do estudo foi determinar se combinações variadas pós-lesão, terapia com progesterona ou transplante de CTN apresentariam melhora motora. Um impacto cortical controlado foi realizado em ratos para criar uma lesão no córtex frontal medial. Foi administrado 10 mg/kg de progesterona ou injeções contendo somente o veículo 4 h após a lesão e a cada 12 h, por 72 h após o início da injeção. Sete dias após a cirurgia, os ratos foram transplantados com CT embrionárias ou veículo. Os ratos foram então testados no teste de campo aberto, labirinto de Barnes, labirinto aquático de Morris e com tarefas Rotor-Rod. Melhores resultados funcionais foram mostrados na maioria das tarefas comportamentais em animais que receberam uma combinação de terapias. Esse efeito foi especialmente proeminente com terapias combinadas. A imuno-histoquímica

mostrou que as CTN transplantadas sobreviveram, migraram e exibiram fenótipos neurais. Esses dados sugerem que uma abordagem politerapêutica após TCE melhora a recuperação funcional para uma maior magnitude. Além disso, quando politerapias são combinadas, os efeitos sobre a recuperação são aprimorados, levando a uma maior recuperação da função.

Skardelly et al. (2011) abordam o transplante experimental de células progenitoras neurais fetais humanas (hfNPC), que provou ser uma abordagem terapêutica promissora após lesão cerebral traumática por TCE. No entanto, a eficácia e a segurança a longo prazo de ambas as terapias altamente importantes para a tradução clínica desta abordagem até agora não foram investigadas. Esse estudo investigou o efeito de células locais (L, 1×10^5) e administração sistêmica (S, 5×10^5 células) de PKH-26 marcado hfNPCs pré-diferenciados durante um período de 12 semanas, começando 24 h após grave TCE de impacto cortical controlado em ratos Sprague-Dawley. Acelerando a haste rotativa, testes revelaram uma tendência de melhora funcional começando uma semana após o transplante e persistindo até o final do experimento. O grau de contusão foi quantificado por ressonância magnética e mostrou ser menor em ambos os grupos de tratamento em comparação com animais de controle (C) (C = 54,50 mm(3), L = 32 mm(3), S = 37,50 mm(3)). Correspondentemente, a coloração neuronal (NeuN) mostrou aumento de sobrevivência neuronal na borda da lesão em ambos os grupos transplantados (S = 92,4%; L = 87,2%; 72,5%). Análise histológica dos compartimentos cerebrais revelou aumento transitório da angiogênese e redução da reação astrogliar durante as primeiras quatro semanas pós-transplante. As células positivas para PKH-26 foram detectadas exclusivamente após transplante local, sem qualquer evidência de formação de tumor. No entanto, a diferenciação do enxerto foi observada apenas em casos muito raros. Em conclusão, o transplante de hfNPCs melhorou o resultado funcional a longo prazo após TCE, com diminuição do tamanho da lesão traumática e aumento da sobrevivência neuronal na zona limítrofe da lesão. Esse efeito terapêutico provavelmente não foi devido à substituição celular, mas foi associado com um aumento transitório da angiogênese e uma astrogliose reduzida.

4 MÉTODOS

Gustavo Bispo dos Santos

4 MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado na comissão científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT/HC-FMUSP) e no comitê de ética de utilização de animais de experimentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Protocolo número 042/14 (**Anexo 1**).

4.1 Cultivo celular

Fêmeas de rato prenhas no 14º dia embrionário (E14) ou ratos neonatos do primeiro ao segundo dia pós-natal (P1–P2) foram sacrificados por saturação de dióxido de carbono para isolamento de tecido para cultivo celular.

Ao todo, cinco fêmeas prenhas no E14 forneceram embriões para cultura celular. Os pares de vesículas telencefálicas foram separados dos cérebros dos ratos em E14 e submetidos à dissociação, conforme explicado abaixo.

Para a obtenção de neonatos, foram obtidas fêmeas prenhas em E14 e mantidas no Centro de Bioterismo do IOT-HC/FMUSP, em gaiolas e estantes com filtragem do ar e sala climatizada, sob ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à água e a alimento. Após o nascimento, ratos nos dias pós-natais (P) 1 (P1) ou 2 (P2), foram sacrificados por saturação de dióxido de carbono, o crânio e as meninges dissecados e a região rostral do cérebro foi isolada. Os bulbos olfatórios foram removidos e os dois hemisférios cerebrais foram separados. Após isolar o hipocampo, a região mais profunda do córtex cerebral, abrangendo a zona subventricular, foi separada para cultivo celular.

4.2 Cultivo primário de neuroesferas

O cultivo primário de neuroesferas foi realizado de acordo com o protocolo de **Marín (2012)**. Os tecidos da vesícula telencefálica em E14 ou do córtex cerebral em P1-P2 foram coletados e lavados em solução salina fosfatada tamponada (PBS). O tampão foi descartado e o tecido foi incubado em 1 a 3 mL de tripsina-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 0,25% por 10 min, a 37°C. A reação de digestão foi interrompida pela adição de igual volume de soro fetal bovino (SFB, Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA). Uma vez depositado o tecido no fundo do microtubo por gravidade, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de meio completo de cultivo de neuroesferas, composto por DMEM/F12 (7:3), piruvato de sódio a 1 mM, B27 a 1%, fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF) a 20 ng/mL, fator de crescimento epidérmico (EGF) a 20 ng/mL, heparina a 5 µg/mL, L-glutamina a 2 mM e penicilina e estreptomicina a 50 U/mL. O tecido foi mecanicamente dissociado usando pipetas com calibres decrescentes até a obtenção de uma solução homogênea, a qual foi filtrada para remover debris celulares (filtro de 100 µm, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). As células foram distribuídas a placas de cultivo de aderência ultrabaixa (Corning, New York, NY, EUA)–1 x 10⁵ células em 2 mL de meio completo por poço de placa de 6 poços ou 1 x 10⁶ em 20 mL de meio completo em frasco T75–e mantidas a 37°C e em CO₂ a 5%, sem troca do meio, por sete dias.

4.3 Passagem e congelamento de neuroesferas

Para passagem das células do cultivo primário, neuroesferas flutuantes foram coletadas em meio de cultivo que foi submetido à centrifugação a 200 x g por 5 min, a 4°C. Células foram ressuspensas em 1 mL de accutase (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA), incubadas por 20 min a 37°C e centrifugadas a 500 x g por 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 500 µL de meio completo e, então, dissociadas diversas vezes com pipetas de Pasteur. Aproximadamente 3 x 10⁴ células dissociadas foram plaqueadas de acordo com as condições de cultura descritas anteriormente, sendo mantidas a 37°C e CO₂ a 5%. Para congelar neuroesferas inteiras com diâmetro de até 100 µm no sétimo dia *in vitro* (DIV), estas foram centrifugadas em meio de cultura a 200 x g por 5 min e ressuspensas em DMEM/F12 (7:3), SFB a 20% e DMSO a 10%, em microtubos criogênicos que foram sequencialmente transferidos para temperaturas decrescentes até a preservação em N₂ líquido.

4.4 Tratamento de diferenciação neuronal *in vitro*

Para a diferenciação neuronal 2D, as neuroesferas foram plaqueadas sob condições de aderência em lamínulas previamente revestidas com poli-D-lisina (PDL; 50 µg/mL em PBS), com ou sem laminina (100 µg/mL em PBS), por 16 horas. Para a diferenciação

neuronal 3D, assim como para os grupos experimentais 5 e 6, 35 μ L de Matrigel[®] foram gotejados sobre um filme plástico estéril Parafilm[®] esticado em uma tampa de placa de Petri e, a ele, foram adicionados 15 μ L de neuroesferas (aproximadamente 1 x 10⁴ células) em meio de diferenciação. A placa foi mantida em incubadora a 37°C por ao menos 30 min, até solidificação. Para o procedimento cirúrgico dos animais do grupo 5, o gel foi imediatamente transferido para o sítio da lesão medular. Para aqueles do grupo 6, o gel foi incubado em meio de diferenciação neuronal, por 24 horas, como a seguir.

Para cultivo *in vitro* e de neuroesferas em gel para o grupo 6, o gel foi transferido para um poço de uma placa de 96 poços contendo meio de diferenciação neuronal (DMEM/F12 (7:3), piruvato de sódio a 1 mM, B27 a 1%, heparina a 2,5 μ g/mL, L-glutamina a 2 mM e penicilina e estreptomicina a 50 U/mL). Então, ele foi mantido a 37°C e em CO₂ a 5% por 24 horas (sistema 3D para o procedimento cirúrgico) ou por até 7 DIV, para ensaios de microscopia.

4.5 Animais para procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico, utilizamos 40 ratos Wistar machos, com peso variando de 300 a 340 g, com idade média de 20 a 21 semanas de vida, oriundos do Centro de Bioterismo da FMUSP.

No momento da recepção, todos os animais foram avaliados quanto às condições gerais (pelagem e estado clínico normais) e à motricidade (motricidade normal), condições para inclusão no estudo.

Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo do IOT-HC/FMUSP, em gaiolas mantidas em estantes metabólicas, climatizadas com filtragem do ar. Cada gaiola (40 x 60 cm) mantinha 2 animais, ração e água filtrada *ad libitum*.

Previamente ao estudo foi realizado o treinamento contínuo dos animais para acostumá-los ao manejo dos experimentadores e estimulá-los a movimentarem-se (condicionamento), facilitando a avaliação da capacidade motora após a lesão. Foram excluídos os casos de: (i) óbito após lesão medular experimental; (ii) anomalias na área lesada da medula observadas macroscopicamente; (iii) autofagia ou mutilação entre os animais; (iv) movimentação normal na primeira avaliação após lesão (21 pontos na escala BBB de avaliação funcional).

Todas as complicações foram registradas para análise estatística.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do IOT/HC-FMUSP.

4.6 Grupos de estudo

Foram estabelecidos três grupos controle e três grupos experimentais, cada um com dez animais. Animais de todos os grupos sofreram laminectomia (**Figura 1**).

4.6.1 Grupos controle

Os três grupos controle se diferenciaram de acordo com os procedimentos citados a seguir:

Grupo 1: lesão medular.

Grupo 2: lesão medular sobre a qual foi depositado veículo (Matrigel[®] 70% em meio de diferenciação neuronal - 15 µL de meio de diferenciação neuronal e 35 µL de Matrigel[®] - definindo um volume total de 50 µL).

Grupo 3: nenhum outro procedimento associado a este grupo, que constituiu o controle negativo da lesão medular – SHAM.

4.6.2 Grupos experimentais

Os grupos 4 a 6 foram experimentais. Todos os animais dos grupos 4 a 6 foram submetidos à lesão medular e tiveram 1×10^4 células de neuroesferas prosencéfalo em P1-P2, de terceira passagem, incorporadas ao tratamento cirúrgico, como discriminado a seguir:

Grupo 4: lesão medular sobre a qual foram depositadas neuroesferas contendo células não diferenciadas, ressuspensas imediatamente antes do enxerto em 50 µL de meio de diferenciação neuronal.

Grupo 5: lesão medular sobre a qual foi depositado gel de Matrigel[®] a 70% (50 µL) contendo neuroesferas com células não diferenciadas, cuja mistura foi realizada 30 minutos antes do enxerto e mantida a 37°C.

Grupo 6: lesão medular sobre a qual foi depositado gel de Matrigel[®] a 70% (50 µL) contendo neuroesferas, cujas células não diferenciadas tiveram diferenciação neuronal

induzida por incubação em meio de diferenciação neuronal, a 37°C e CO₂ a 5%, por 24 horas até o procedimento cirúrgico.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Laminectomia					
LM	LM		LM	LM	LM
	Meio de cultivo		Meio de cultivo	Meio de cultivo	Meio de cultivo
	Matrigel			Matrigel	Matrigel
			N. células	N. células	N. células
			Imediato	Imediato	1 DIV

Figura 1: Procedimentos cirúrgicos associados a cada grupo, controle (1 a 3) ou experimental (4 a 6). LM: lesão medular; N. Células: enxerto de neuroesferas; Veículo: Matrigel®; Meio de cultivo: meio de diferenciação neuronal; Imediato: mistura realizada após anestesia do animal; 1DIV: mistura realizada 24 horas antes da anestesia do animal.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.7 Procedimento cirúrgico

Para a realização da lesão medular, os animais foram submetidos à injeção subcutânea de cloridrato de tramadol na dose de 5 mg/kg e pentabiótico na dose de 24.000 UI/kg (Grimm et al., 2015).

Com o uso de uma caixa de acrílico, os animais foram induzidos à anestesia com isoflurano (1,5 vols.% a 2,0 vols.%) em 100% de oxigênio (Figura 2).

Após sedação leve, uma máscara foi colocada para cobrir todo o focinho do animal, levando a um plano anestésico mais profundo para, então, realizar-se a tricotomia e limpeza da região dorsal (Figura 3).

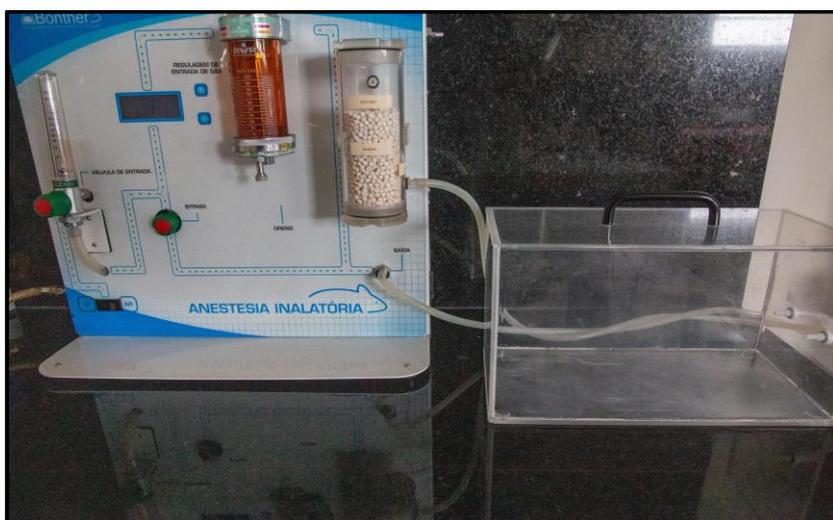


Figura 2 – Equipamento de anestesia inalatória
Fonte: Arquivo pessoal do autor



Figura 3 – Máscara para anestesia inalatória
Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.7.1 Modelo de lesão medular

Após tricotomia, foi realizada uma incisão na linha média dorsal para expor os arcos posteriores da coluna vertebral, de T 8 a T 12 (**Figura 4**).

A exposição da medula para contusão controlada foi realizada com o auxílio de um microscópio cirúrgico.



Figura 4 – Animal posicionado em decúbito esternal e incisão em região dorsal.
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Os músculos inseridos nos processos espinhosos e nas lâminas de T9 a T11, foram descolados das suas inserções ósseas.

A hemostasia, quando necessária, foi realizada com um coagulador bipolar. Foram removidos com um micro saca-bocados, o processo espinhoso, a lâmina da vértebra T8 e processo espinhoso da até expor a medula e permitir o posicionamento da ponta da haste do NYU-Impactor (New York University, 1993; Young, 2009) (Figura 5).



Figura 5 – Animal posicionado para ser submetido à contusão medular e contato inicial do equipamento com a medula.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Após o posicionamento do animal, o equipamento foi devidamente calibrado na altura de 12,5 mm, causando uma contusão moderada (Basso et al. 1995) (Figura 6).

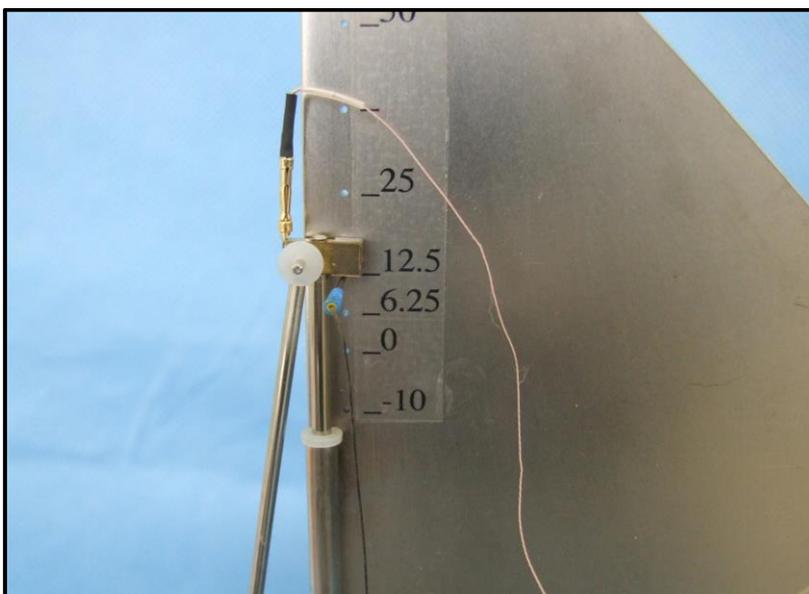


Figura 6 – Calibração do MASCIS Impactor

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Após confirmação da contusão medular, foi realizada sutura em bloco da musculatura paravertebral e posteriormente sutura cutânea (**Figuras 7 e 8**).



Figura 7 – Sutura em bloco da musculatura dorsal
Fonte: Arquivo pessoal do autor



Figura 8 – Sutura cutânea
Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.7.2 Protocolo pós-operatório

Foi ministrado cloridrato de tramadol na dose de 5 mg/kg a cada oito horas, durante cinco dias; pentabiótico, na dose de 24.000 UI/kg a cada 12 horas, durante sete dias; e meloxicam, na dose 5 mg/kg uma vez ao dia, durante três dias (Flecknell 2015).

Após a lesão medular, os animais apresentaram bexiga neurogênica, sendo necessário a realização de massagem para esvaziamento vesical duas vezes ao dia, durante cinco dias (Cristante et al., 2013; Paschon et al., 2019; Santos et al., 2011).

Os ratos retornaram às mesmas gaiolas de origem (40 cm x 60 cm), mantidos somente em dois animais, nas mesmas condições ambientais (manejo, alimentação *ad libitum*, troca periódica da maravalha e limpeza da gaiola) até o final do experimento. Os ratos foram observados quanto a mutilações, infecções ou outras alterações (critérios de exclusão e complicações).

4.8 Medidas funcionais de desfecho

Durante o período pós-operatório de 42 dias, a recuperação da capacidade locomotora após lesão medular foi medida de acordo com a escala BBB de avaliação funcional (Basso et al., 1995).

4.9 Medidas morfológicas de desfecho

Após a realização da avaliação motora final, os animais foram submetidos ao protocolo de anestesia e submetidos à perfusão transcardíaca, quando foram utilizadas as soluções salina tamponada e de paraformaldeído a 4% tamponado (fixador), em pH fisiológico.

A medula espinal foi cuidadosamente extraída de todos os animais imediatamente após perfusão e morte indolor induzida. Essas estruturas permaneceram no mesmo fixador por 24 horas. Com um micro saca-bocados, retiraram-se, cuidadosamente, todas as estruturas ósseas e partes moles adjacentes à medula até expô-la completamente.

Realizou-se uma avaliação visual macroscópica da medula no local da contusão para se verificar qualquer anomalia (critério de exclusão).

Realizou-se incisão ventral, com toracotomia e laparotomia associadas. Os pulmões foram inspecionados para a identificação de possíveis alterações, como a presença de empiema ou condensação. No abdômen, focalizou-se a inspeção da bexiga, para a identificação de bexiga neurogênica flácida (com aumento importante de volume) ou de alterações sugestivas de infecção (hiperemia e hematúria). Os dados assim coletados foram listados para posterior análise estatística de complicações associadas.

A seguir, a medula retirada foi encaminhada individualmente, em frasco devidamente identificado, com solução de formaldeído (10%), para o Serviço de Anatomia Patológica do IOT-HC/FMUSP.

O estudo anatomopatológico consistiu em uma análise microscópica (óptica) de lâminas coradas pela HE.

Realizaram-se cortes histológicos no plano axial, no segmento medular, com intervalos de 2 mm, representando toda a área lesada, em uma extensão de 1 cm a partir do centro da lesão. Esse material foi processado e desidratado em bateria de álcoois, depois sofreu processo de diafanização em xilol e, posteriormente, foi incluído em parafina. Uma vez contido no bloco de parafina, foram feitos cortes histológicos de 5 µm em micrótom. Esses cortes foram realizados longitudinalmente em todo o segmento medular.

O material foi, então, fixado em lâminas de vidro e corados pela técnica de HE.

O Serviço de Patologia avaliou e graduou (ausente – 0, discreta – 1, moderada – 2 e acentuada – 3) todos os fragmentos quanto à presença de necrose; hemorragia; hiperemia; degeneração da substância nervosa (degeneração cística); e infiltrado celular. Os patologistas não foram informados quanto ao grupo de origem a que pertenciam as medulas dos ratos (avaliação cega).

4.10 Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram descritos segundo grupos e momentos de avaliação com o uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparados com uso de equações de estimação generalizadas (EEG) com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos de avaliação para a escala BBB, as variações de peso dos animais foram

descritas segundo grupos e comparadas com uso de análise de variâncias (ANOVA) (Neter et. al., 1996). Já os parâmetros histológicos foram descritos segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e comparados entre grupos com o uso de modelos lineares generalizados (MLG) com distribuição Poisson e função de ligação identidade. Todas as análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para identificar entre quais grupos ou momentos ocorreram as diferenças (Neter et. al., 1996).

Para a realização das análises, foi utilizado o software IBM-SPSS para Windows, versão 22.0, e para tabulação dos dados, foi utilizado o software Microsoft Excel 2013. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%

5 RESULTADOS

Gustavo Bispo dos Santos

5 Resultados

5.1 Cultivo primário de neuroesferas

O protocolo de cultura primária de células de vesículas telencefálicas de ratos em E14 forneceu neuroesferas flutuantes que, quando submetidas a tratamento para diferenciação neuronal, apresentaram prolongamentos como processos neuronais, observados após 16 ou 60 horas sob condições de cultivo bi- ou tridimensional (**Figura 9**).

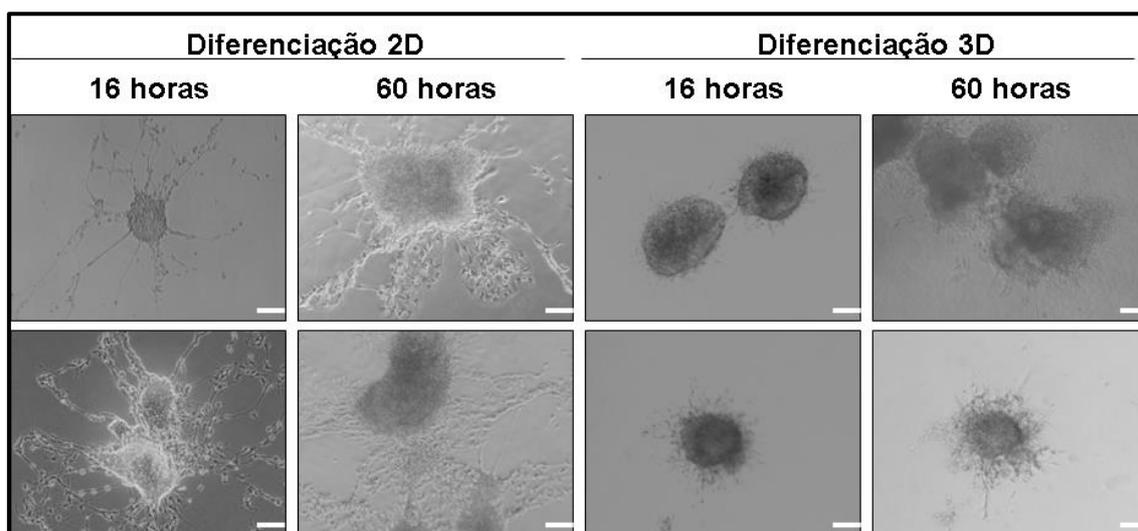


Figura 9 – Neuroesferas obtidas em suspensão de vesícula telencefálica de ratos em E14 e semeadas após 7DIV, em meio de diferenciação neuronal, sobre placa revestida com poli-D-lisina (diferenciação 2D) ou ressuspensas em Matrigel® que foi posteriormente gelificado a 37°C (diferenciação 3D). Cultivo por 16 horas ou 60 horas, como indicado. Imagens obtidas em campo claro ao microscópio Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha) conjugado à câmera AxioCam MRC5 camera (Zeiss). Barra de escala: 25 µm.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

O fornecimento de ratas prenhes foi suspenso pelo biotério e passamos a acasalar os animais, obtendo uma taxa elevada de pseudoprenhez. Diante disso, optamos por realizar o cultivo primário a partir da dissociação de tecido de prosencéfalo de ratos neonatos, em P1-P2. Uma vez estabelecido o cultivo de neuroesferas desse material, foram realizadas duas passagens e teste de congelamento das células, e demonstrada a formação de neuroesferas após descongelamento e recultivo de células em suspensão da terceira passagem (**Figura 10, painel superior**). O aumento no tamanho das esferas foi registrado *in vitro* por 14 dias (DIV; Figura 10), com um resultado indicativo de auto-

renovação e proliferação celular, duas propriedades de CT (da Silva Siqueira et al., 2021). Em microscopia de campo claro, as neuroesferas da terceira passagem tratadas para diferenciação neuronal 2D por até 7DIV, em lamínulas revestidas com PDL, com ou sem laminina, revelaram processos de alongamento, bem como corpos celulares posicionados distantes das esferas (**Figura 10**), um indicativo do fenótipo neuronal.

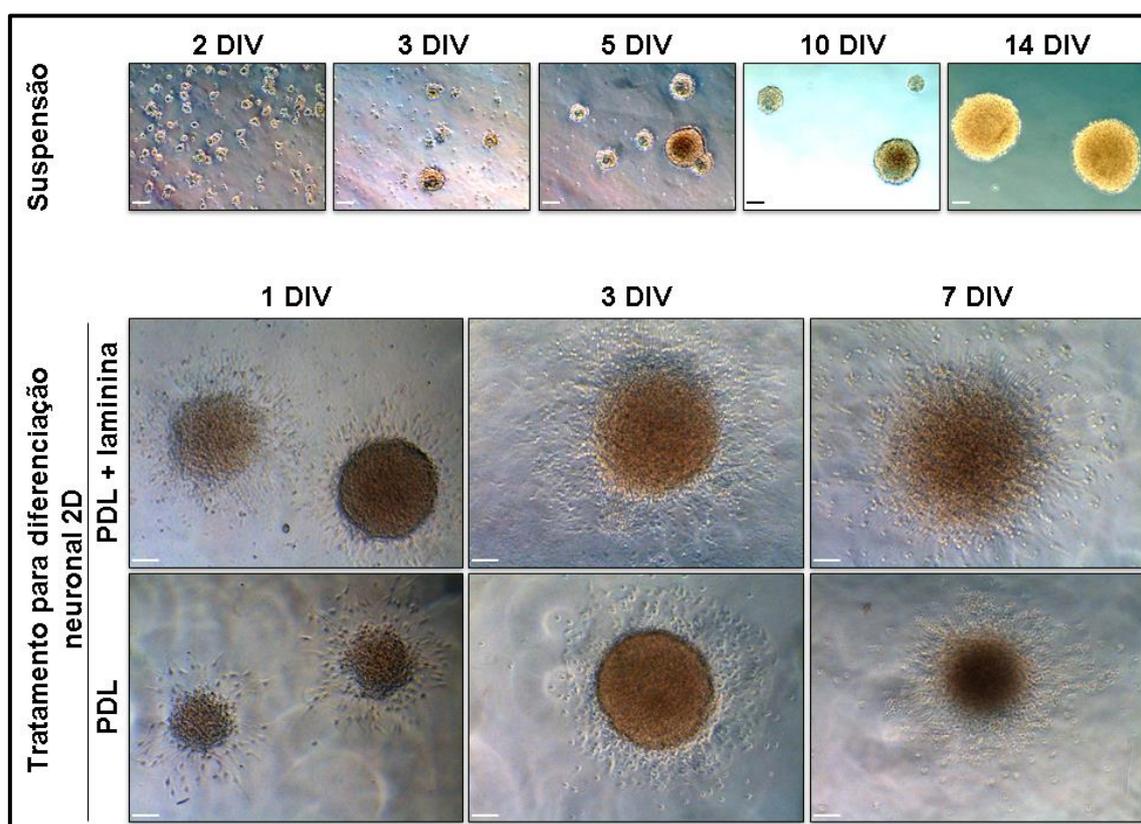


Figura 10: Cultura de prosencéfalo dissociado de ratos em P1–P2 produz neuroesferas flutuantes que se diferenciam em células com fenótipo neuronal. As neuroesferas formadas após a terceira passagem (painel superior, “Suspensão”) mostram tamanho crescente ao longo de duas semanas *in vitro*. O tratamento de diferenciação neuronal 2D das neuroesferas na terceira passagem (painéis do meio e inferior) indica a processos celulares com comprimentos crescentes de 1 DIV a 7 DIV. Todas as imagens foram obtidas por microscopia de campo claro usando o microscópio Axiovert 40C (Zeiss, Alemanha) e a câmera conjugada AxioCam MRC5 (Zeiss). Barras de escala: 50 μ m.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

5.2 Procedimento cirúrgico e avaliação do estado geral dos animais

Para testar o potencial terapêutico de células de neuroesferas de terceira passagem, obtidas de prosencéfalo de ratos neonatos, em modelo experimental de lesão contusiva de medula espinal (T8–T9) de ratos, estabeleceram-se seis grupos, com dez ratos machos, cada (**Figura 1**). Animais de todos os grupos foram submetidos à laminectomia. Aqueles

nos grupos 1, 2, 4, 5 e 6 foram submetidos à lesão contusiva da medula e o grupo 3 representou o controle negativo dessa lesão (sham). Animais do grupo 2 receberam veículo (Matrigel[®] em meio de diferenciação neuronal). Os três grupos que receberam células de neuroesferas não diferenciadas de prosencéfalo de ratos neonatos (P1–P2) diferiram por elas serem ressuspensas diretamente em meio de diferenciação neuronal (grupo 4) ou nesse meio com Matrigel[®] a 70% (grupos 5 e 6). No grupo 5, uma vez gelificado, o Matrigel[®] contendo células foi depositado imediatamente sobre a lesão. Para o grupo 6, as células em gel foram incubadas em meio de diferenciação neuronal por 24 horas antes do depósito sobre a lesão.

No grupo 1 ocorreu um óbito, imediatamente após a contusão medular e esse animal foi substituído. No grupo 3 ocorreu 1 óbito, imediatamente após a contusão medular e esse animal foi substituído.

O peso corporal dos animais foi similar entre os grupos tanto antes quanto ao fim (sexta semana) do experimento (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; **Tabela 1**). Ao longo das seis semanas do período pós-operatório, houve um aumento significativo no peso corporal médio dos animais dos grupos 2, 3 e 5 (teste t de Student, $p < 0,05$), mas não daqueles pertencentes aos grupos 1, 4 e 6 (teste t de Student, $p > 0,05$). Quando os pesos corporais antes da cirurgia e na sexta semana foram comparados, a diferença (ganho em peso corpóreo) para os animais do grupo 3 (Sham) foi maior do que para qualquer outro grupo (Kruskal-Wallis, $p = 0,007$ entre os grupos, e teste post hoc de Dunn, $p < 0,05$ para qualquer grupo comparado ao grupo 3).

Tabela 1 – Peso corpóreo dos animais dos seis grupos, antes do procedimento cirúrgico e na sexta semana (S6) e a diferença (Δ) entre eles

Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3			
Animal	Antes	S6	Δ	Animal	Antes	S6	Δ	Animal	Antes	S6	Δ
1	234	268	34	11	276	312	36	21	297	345	48
2	244	276	32	12	256	277	21	22	301	355	54
3	265	288	23	13	298	312	14	23	288	324	36
4	321	344	23	14	288	310	22	24	295	332	37
5	332	339	7	15	266	321	55	25	312	342	30
6	344	354	10	16	298	332	34	26	322	365	43
7	321	365	44	17	335	356	21	27	288	322	34
8	354	366	12	18	324	353	29	28	304	365	61
9	298	312	14	19	287	325	38	29	312	354	42
10	267	288	21	20	304	325	21	30	314	358	44
Média	298	320	22	Média	293,2	322	29,1	Média	303,3	346	42,9
Grupo 4				Grupo 5				Grupo 6			
Animal	Antes	S6	Δ	Animal	Antes	S6	Δ	Animal	Antes	S6	Δ
31	254	267	13	41	310	322	12	51	234	268	34
32	233	245	12	42	267	289	22	52	244	276	32
33	245	287	42	43	310	345	35	53	265	288	23
34	305	334	29	44	309	325	16	54	321	344	23
35	287	312	25	45	276	315	39	55	332	339	7
36	355	365	10	46	300	322	22	56	344	354	10
37	322	344	22	47	317	355	38	57	321	365	44
38	323	332	9	48	332	343	11	58	354	366	12
39	315	355	40	49	298	312	14	59	298	312	14
40	308	344	36	50	309	345	36	60	267	288	21
Média	294,7	319	23,8	Média	302,8	327	24,5	Média	298	320	22

Fonte: Arquivo pessoal do autor

5.3 Avaliação funcional motora pela escala BBB

Os dados referentes à função motora foram obtidos no segundo dia de pós-operatório (D2) e ao final das semanas (S) 1 (S1), 2 (S2), 3 (S3), 4 (S4), 5 (S5) e 6 (S6). Os efeitos da contusão medular sobre a função motora (D2) e os efeitos da recuperação motora pós-operatória (D2–S6) foram avaliados usando a escala desenvolvida por Basso, Beattie e Bresnahan (escala BBB) com base em dez categorias de comportamento, abrangendo desde o movimento dos membros até a posição da cauda no espaço, resultando em um escore final de zero a 21 pontos (Basso et al., 1995). Todos os valores

obtidos na escala BBB para cada animal, nos dias D2, S1, S2, S3, S4, S5 e S6, estão apresentados na **Tabela 2**. Em D2, pelo menos sete animais (70%) de cada um dos grupos 1, 2, 4, 5 e 6 apresentaram um escore de zero pontos na escala BBB, enquanto os outros obtiveram 1 ou 2 pontos. Nesse dia, os animais do grupo 3 (sham) atingiram 21 pontos na escala BBB. Esses dados mostraram a eficiência da contusão medular, a homogeneidade entre os animais de cada grupo e a ausência de efeito da laminectomia, isoladamente, sobre as funções motoras avaliadas.

Tabela 2 – Pontuação na escala BBB de animais dos seis grupos, em sete dias experimentais (D2, S1, S2, S3, S4, S5 e S6)

(continua)

Animal	Grupo	D2	S1	S2	S3	S4	S5	S6
1	1	0	1	2	4	5	9	9
2	1	1	1	2	2	6	8	8
3	1	0	0	2	4	9	9	11
4	1	0	1	1	3	8	7	8
5	1	0	0	3	3	7	7	7
6	1	0	0	2	2	6	7	7
7	1	0	0	2	2	4	5	8
8	1	1	2	4	4	7	5	6
9	1	0	1	3	4	6	7	9
10	1	1	2	6	4	4	4	5
11	2	0	1	4	8	7	8	10
12	2	0	1	2	4	4	8	8
13	2	0	1	3	4	8	9	10
14	2	1	1	4	4	5	6	8
15	2	0	0	4	6	6	8	9
16	2	0	1	2	8	9	9	10
17	2	0	0	3	5	7	9	9
18	2	0	1	2	4	6	8	8
19	2	0	1	3	6	8	9	10

Animal	Grupo	D2	S1	S2	S3	S4	S5	S6
20	2	0	1	2	4	6	6	9
21	3	21	21	21	21	21	21	21
22	3	21	21	21	21	21	21	21
23	3	21	21	21	21	21	21	21
24	3	21	21	21	21	21	21	21
25	3	21	21	21	21	21	21	21
26	3	21	21	21	21	21	21	21
27	3	21	21	21	21	21	21	21
28	3	21	21	21	21	21	21	21
29	3	21	21	21	21	21	21	21
30	3	21	21	21	21	21	21	21
31	4	0	1	2	4	5	9	10
32	4	1	1	2	2	6	8	12
33	4	0	0	2	4	11	9	10
34	4	0	2	6	8	8	10	11
35	4	0	2	4	6	8	11	11
36	4	0	1	4	6	6	7	10
37	4	0	2	4	4	8	12	12
38	4	1	2	4	8	10	10	12
39	4	0	1	3	4	6	7	9
40	4	1	2	6	8	8	11	12
41	5	0	1	4	8	7	10	12
42	5	2	1	4	8	11	12	15
43	5	0	2	3	8	10	12	14
44	5	1	2	4	8	8	12	12
45	5	0	0	4	6	10	14	15
46	5	0	1	2	8	10	12	14
47	5	0	2	4	10	12	13	14
48	5	0	2	6	10	12	12	14

Animal	Grupo	D2	S1	S2	S3	S4	S5	S6
49	5	0	2	4	8	8	10	12
50	5	0	1	3	7	12	14	15
51	6	0	1	4	8	7	8	10
52	6	2	1	5	6	8	8	10
53	6	0	0	3	4	8	9	10
54	6	1	1	4	4	5	6	8
55	6	0	0	4	6	6	8	9
56	6	0	1	2	8	9	9	10
57	6	0	0	3	5	7	9	9
58	6	2	1	4	4	9	10	12
59	6	0	1	3	6	8	9	10
60	6	0	1	3	7	11	11	11

A cor em cada célula representa a graduação da pontuação zero (vermelho escuro) até 21 (verde escuro).

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Como esperado, animais do grupo 3 (sham) apresentaram valores elevados na escala BBB e não foram considerados na análise comparativa. Logo, as comparações consideraram os grupos 1, 2, 4, 5 e 6. A **Tabela 3** mostra que para um dado momento pós-operatório, a média dos valores do BBB foi semelhante ($p_{\text{Interação}} = 0,08$). Por outro lado, houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos independente do momento de avaliação ($p_{\text{Grupo}} < 0,001$) e entre os momentos independente do grupo ($p_{\text{Momento}} < 0,001$).

Tabela 3 – Escore na escala BBB de animais de cada um dos grupos em momentos diferentes da avaliação

Grupo	Momento de avaliação pós-operatória							P Grupo	P Momento	P Interação
	2 dias	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6			
BBB								<0,001	<0,001	0,081
Grupo 1										
média ± DP	0,3 ± 0,48	0,8 ± 0,79	2,7 ± 1,42	3,2 ± 0,92	6,2 ± 1,62	6,8 ± 1,69	7,8 ± 1,69			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	1 (0; 2)	2 (1; 6)	3,5 (2; 4)	6 (4; 9)	7 (4; 9)	8 (5; 11)			
Grupo 2										
média ± DP	0,1 ± 0,32	0,8 ± 0,42	2,9 ± 0,88	5,3 ± 1,64	6,6 ± 1,51	8 ± 1,16	9,1 ± 0,88			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	1 (0; 1)	3 (2; 4)	4,5 (4; 8)	6,5 (4; 9)	8 (6; 9)	9 (8; 10)			
Grupo 3										
média ± DP	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0	21 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)	21 (21; 21)			
Grupo 4										
média ± DP	0,3 ± 0,48	1,4 ± 0,7	3,7 ± 1,49	5,4 ± 2,12	7,6 ± 1,9	9,4 ± 1,71	10,9 ± 1,1			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	1,5 (0; 2)	4 (2; 6)	5 (2; 8)	8 (5; 11)	9,5 (7; 12)	11 (9; 12)			
Grupo 5										
média ± DP	0,3 ± 0,68	1,4 ± 0,7	3,8 ± 1,03	8,1 ± 1,2	10 ± 1,83	12,1 ± 1,37	13,7 ± 1,25			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 2)	1,5 (0; 2)	4 (2; 6)	8 (6; 10)	10 (7; 12)	12 (10; 14)	14 (12; 15)			
Grupo 6										
média ± DP	0,5 ± 0,85	0,7 ± 0,48	3,5 ± 0,85	5,8 ± 1,55	7,8 ± 1,69	8,7 ± 1,34	9,9 ± 1,1			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 2)	1 (0; 1)	3,5 (2; 5)	6 (4; 8)	8 (5; 11)	9 (6; 11)	10 (8; 12)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos. Foram usados os momentos 3 e 6 semanas para a análise e não foi utilizado o grupo sham. Média: média dos escores BBB dos animais do grupo; Mediana: mediana dos escores BBB dos animais do grupo; DP: desvio padrão; mín.: menor valor; máx.: maior valor.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Comparações não pareadas de valores da escala BBB ao longo do período pós-operatório, do D2 até a S6, revelaram uma melhora na função motora internamente em cada grupo (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$; **Figura 11A**). As análises pareadas post hoc do grupo 1 mostraram incrementos significativos nos escores BBB (teste de Dunn, $p < 0,05$) na S4 (em comparação com o D2 ou a S1) e na S6 (em comparação com a S2; Figura 4). A recuperação motora funcional foi igualmente observada nos referidos intervalos de tempo para os grupos 2, 4, 5 e 6 (**Figura 11B**). Além disso, os animais desses quatro grupos apresentaram melhora na função motora já na S3, em comparação com o D2 (**Figura 11B**). Nos grupos 2 e 5, a recuperação motora funcional ocorreu ainda antes, com diferenças significativas para as seguintes comparações: S2 vs. D2, S3 vs. S1 e S4 vs. S2 ($p < 0,05$; **Figura 11B**). Portanto, a melhora da função motora ao longo da duração do experimento foi similar e precoce em ambos os grupos 2 e 5 (**Figura 11**).

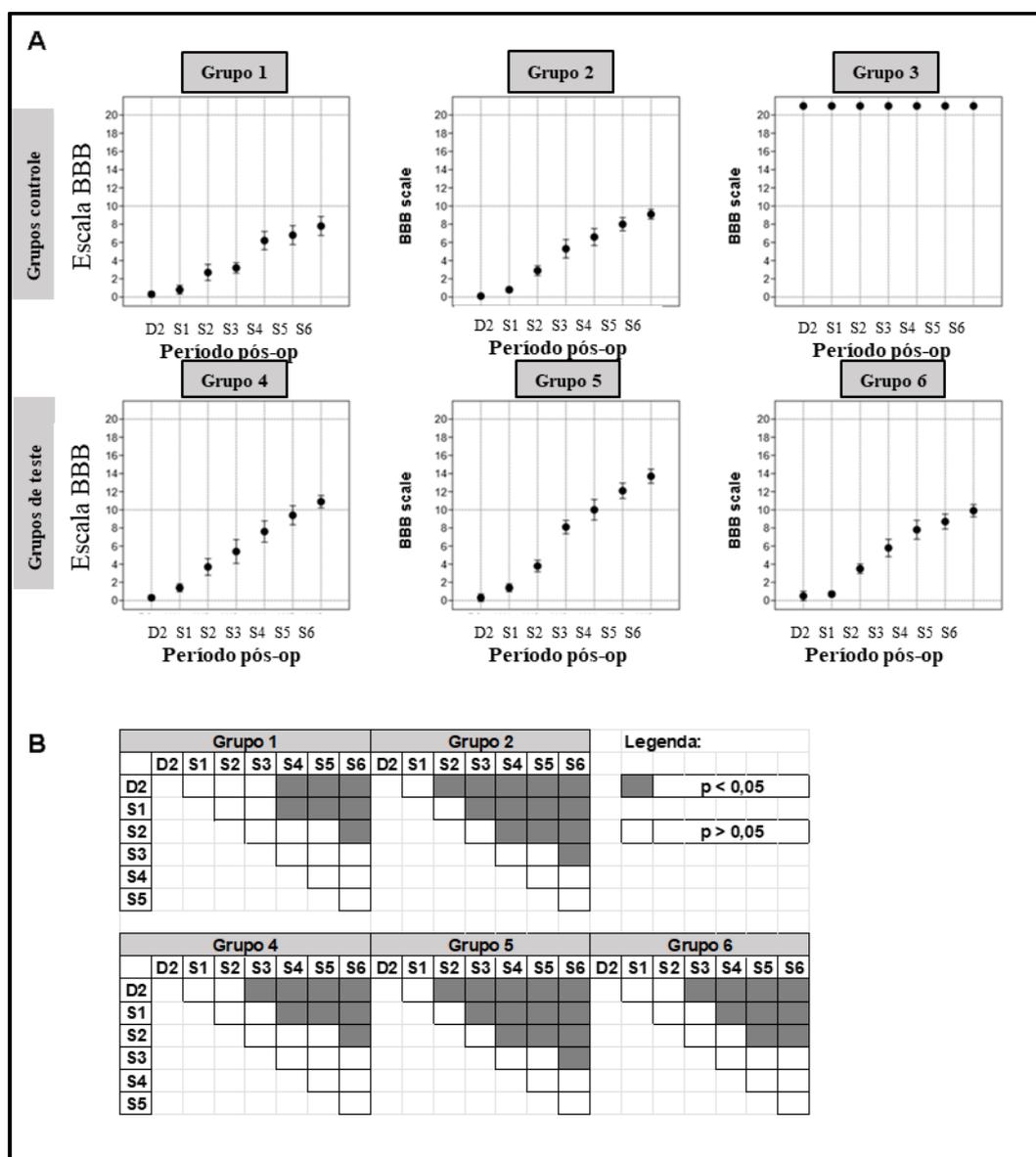


Figura 11 – (A) Gráficos do escore na escala BBB para os grupos controle, 1–3, e para os grupos de teste (célula), 4–6, conforme indicado. O escore BBB é representado por média e desvio padrão (IC 95%) de acordo com a avaliação realizada no D2 e na S1, S2, S3, S4, S5 e S6 de pós-operatório. (B) Análise post hoc de Dunn do escore BBB para cinco grupos, conforme indicado. Os quadrados brancos e cinzas indicam, respectivamente, comparações não significativas ($p > 0,05$) e significativas ($p < 0,05$) de escores entre o(a) dia/semana indicado(a) à esquerda e cada período da respectiva coluna para cada grupo.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A partir da S3, houve uma diferença significativa nos escores BBB entre os grupos em cada marco temporal (S3, S4, S5 ou S6; Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Para verificar o melhor resultado no período S3 a S6, dois marcos temporais (S3 e S6) foram considerados para comparações pareadas entre grupos. Uma diferença de escore BBB foi obtida para cada animal entre a S6 e a S3. A média da diferença BBB para o grupo

foi subtraída da média da diferença BBB na S6–S3 obtida para o grupo de referência. O valor obtido representou a diferença média dos escores BBB entre os grupos no intervalo que abrange as três semanas finais do experimento. A média dos valores BBB não apresentou diferença em quaisquer comparações pareadas para os grupos 2, 4 e 6 ($p > 0,05$; **Figura 12**). Os grupos 2, 4, 5 e 6 se diferenciaram do grupo 1 ($p < 0,05$), que apresentou o mais baixo escore entre todos os grupos (**Figura 12**). O grupo 5 apresentou a mais alta média no escore BBB entre todos os grupos de animais submetidos à contusão medular (**Figura 12**).

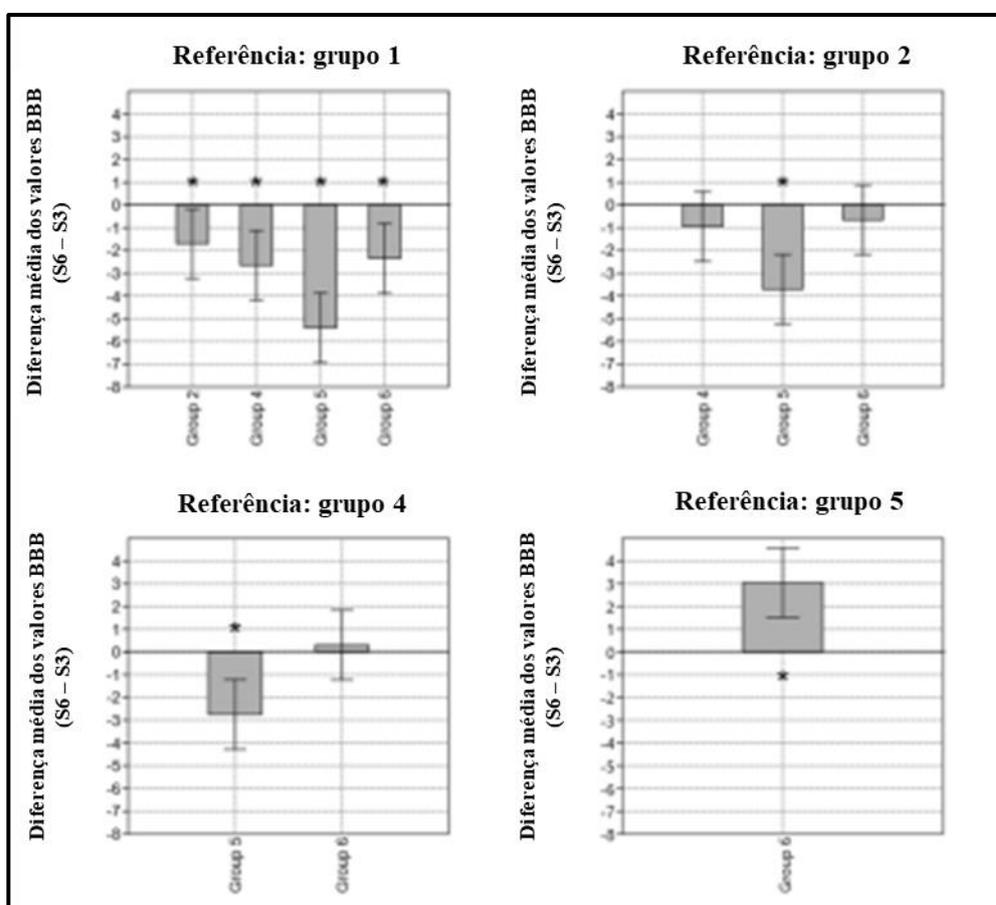


Figura 12 – Gráfico de barras da diferença entre as médias de valores BBB (IC 95%) para a S6 e a S3. A diferença média para cada grupo representado no eixo X foi subtraída da diferença média do grupo de referência indicado no topo de cada gráfico. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas (Bonferroni; $p < 0,05$) com relação ao grupo de referência.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

5.4 Análise morfológica da medula espinal

Os parâmetros histológicos de necrose e presença de eritrócitos foram

classificados em quatro graus de acordo com a frequência de sua observação em tecido medular corado por HE (**Tabela 4**). Os graus (Gr0, Gr1, Gr2 e Gr3) correspondiam, respectivamente, à presença ausente, discreta, moderada ou acentuada. O terceiro parâmetro analisado (presença de leucócitos) foi classificado do Gr0 ao Gr2. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$; **Figura 13**). Todavia, a presença de necrose e leucócitos foi, de modo geral, de mais discreta à ausente no grupo 5 em comparação aos outros grupos de animais submetidos à contusão medular (**Figura 13, A e C**).

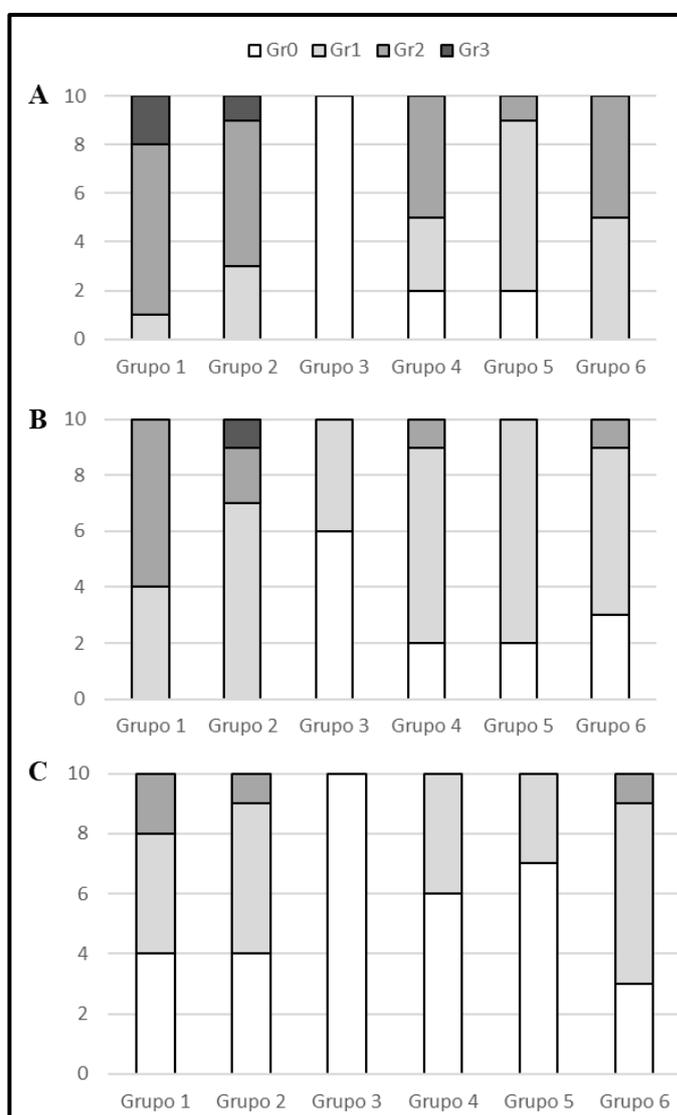


Figura 13 – Gráficos das análises histológicas de acordo com a presença de necrose (A), eritrócitos (B) e leucócitos (D). A legenda indica os graus de avaliação (Gr) como Gr0 (ausente), Gr1 (discreta), Gr2 (moderada) ou Gr3 (acentuada). A distribuição se dá de acordo com o número de animais em cada grupo (de dez) classificados no respectivo grau.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Tabela 4 – Descrição dos parâmetros histológicos segundo grupos e resultado das comparações

Variável	Grupo						p
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	
Necrose							0,189
Ausente	0 (0)	0 (0)	10 (100)	2 (20)	2 (20)	0 (0)	
Discreto	1 (10)	3 (30)	0 (0)	3 (30)	7 (70)	5 (50)	
Moderado	7 (70)	6 (60)	0 (0)	5 (50)	1 (10)	5 (50)	
Intenso	2 (20)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Hemorragia							0,343
Ausente	0 (0)	0 (0)	6 (60)	2 (20)	2 (20)	3 (30)	
Discreto	4 (40)	7 (70)	4 (40)	7 (70)	8 (80)	6 (60)	
Moderado	6 (60)	2 (20)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1 (10)	
Intenso	0 (0)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Hiperemia							0,120
Ausente	1 (10)	4 (40)	6 (60)	5 (50)	4 (40)	2 (20)	
Discreto	3 (30)	4 (40)	4 (40)	5 (50)	4 (40)	5 (50)	
Moderado	4 (40)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	3 (30)	
Intenso	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Degeneração							0,589
Ausente	0 (0)	0 (0)	10 (100)	1 (10)	2 (20)	2 (20)	
Discreto	7 (70)	7 (70)	0 (0)	4 (40)	8 (80)	7 (70)	
Moderado	3 (30)	3 (30)	0 (0)	5 (50)	0 (0)	1 (10)	
Infiltrado							0,356
Celular							
Ausente	4 (40)	4 (40)	10 (100)	6 (60)	7 (70)	3 (30)	
Discreto	4 (40)	5 (50)	0 (0)	4 (40)	3 (30)	6 (60)	
Moderado	2 (20)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	

MLG com distribuição de Poisson e função de ligação identidade; o grupo Sham (grupo 3) não entrou nas análises

Fonte: Arquivo pessoal do autor

5.5 Avaliação de ganho de peso dos animais pós-operatório

Pela **Tabela 5**, tem-se que a variação percentual média do peso dos animais diferiu estatisticamente entre os grupos ($p = 0,001$).

Tabela 5 – Descrição do peso dos animais, segundo grupos, no início e ao final do estudo e variações de peso e resultado das comparações das variações entre os grupos

Variável	Momento		Ganho de peso (%)	p
	Inicial	Final		
Peso (g)				0,001
Lesão medular				
média ± DP	298 ± 42,9	320 ± 38	7,8 ± 4,7	
mediana (mín.; máx.)	309,5 (234; 354)	325,5 (268; 366)	7,5 (2,1; 14,5)	
Lesão medular + Veículo				
média ± DP	293,2 ± 24,4	322,3 ± 22,6	10,1 ± 4,7	
mediana (mín.; máx.)	293 (256; 335)	323 (277; 356)	8,6 (4,7; 20,7)	
Sham				
média ± DP	303,3 ± 11,5	346,2 ± 15,9	14,1 ± 3,1	
mediana (mín.; máx.)	302,5 (288; 322)	349,5 (322; 365)	13,4 (9,6; 20,1)	
Lesão Medular + Meio de Cultivo + Célula Não Diferenciada				
média ± DP	298 ± 42,9	320 ± 38	7,8 ± 4,7	
mediana (mín.; máx.)	309,5 (234; 354)	325,5 (268; 366)	7,5 (2,1; 14,5)	
Lesão Medular + Veículo + Células Não Diferenciadas				
média ± DP	293,2 ± 24,4	322,3 ± 22,6	10,1 ± 4,7	
mediana (mín.; máx.)	293 (256; 335)	323 (277; 356)	8,6 (4,7; 20,7)	
Lesão Medular + Veículo + Células Diferenciadas 24 horas				
média ± DP	30336 ± 11,5	346,2 ± 15,9	14,1 ± 3,1	
mediana (mín.; máx.)	302,5 (288; 322)	349,5 (322; 365)	13,4 (9,6; 20,1)	

ANOVA

Fonte: Arquivo pessoal do autor

A **Tabela 6** mostra que os grupos de animais 3 e 6 apresentaram estatisticamente maior ganho de peso médio que os animais dos grupos 1 e 4 ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Resultado das comparações múltiplas do peso entre grupos e momentos avaliados

Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
				Inferior	Superior
Grupo 1 - Grupo 2	-2,29	1,88	>0,999	-8,70	3,49
Grupo 1 - Grupo 3	-6,33	1,88	0,021	-12,11	-0,55
Grupo 1 - Grupo 4	0,00	1,88	>0,999	-0,58	5,78
Grupo 1 - Grupo 5	-2,29	1,88	>0,999	-8,07	3,49
Grupo 1 - Grupo 6	-6,33	1,88	0,021	-12,11	-0,55
Grupo 2 - Grupo 3	-4,04	1,88	0,543	-9,82	1,74
Grupo 2 - Grupo 4	2,29	1,88	>0,999	-3,49	8,07
Grupo 2 - Grupo 5	0,00	1,88	>0,999	-5,78	5,78
Grupo 2 - Grupo 6	-4,04	1,88	0,543	-9,82	1,74
Grupo 3 - Grupo 4	6,33	1,88	0,021	0,55	12,11
Grupo 3 - Grupo 5	4,04	1,88	0,543	-1,74	9,82
Grupo 3 - Grupo 6	0,00	1,88	>0,999	-5,78	5,78
Grupo 4 - Grupo 5	-2,29	1,88	>0,999	-8,07	3,49
Grupo 4 - Grupo 6	-6,33	1,88	0,021	-12,11	-0,55
Grupo 5 - Grupo 6	-4,04	1,88	0,543	-9,82	1,74

Comparações múltiplas de Bonferroni

Fonte: Arquivo pessoal do autor

6 DISCUSSÃO

Gustavo Bispo dos Santos

6 DISCUSSÃO

Até há pouco tempo, o sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos era tido como incapaz de se reparar ou se regenerar após algum grau de lesão (Mizushima et al., 2001). Contudo, demonstra-se que para recuperação da qualidade de vida do paciente com lesão medular, a medula não necessariamente precisaria ser totalmente reconstruída. Benefícios desproporcionais podem ser obtidos de mínimas reparações anatômicas (Blight, 1983).

A incidência anual de lesões espinais traumáticas varia de 15,8 a 58,6 por milhão de habitantes, com prevalência de 583 por milhão. As causas mais comuns são acidentes automobilísticos, variando entre 40% e 50% dos casos, quedas e acidentes de trabalho com 20% dos casos, práticas esportivas e violência, com 10% a 25% (Sekhon e Fehlings, 2001).

São necessárias novas pesquisas rigorosas para elucidação do complexo sistema de reações que ocorrem após o TRM (Amador e Guest 2005; Rossignol et al., 2007).

O modelo experimental através de queda de peso, em ratos Wistar, para a produção de lesão medular moderada, foi selecionado porque permite a padronização e a uniformização da amostra. Estudos clínicos, tanto na medicina veterinária quanto na humana, levam um tempo muito maior e o acompanhamento dos pacientes é muito mais difícil.

A utilização de ratos *Wistar* em modelos de lesão medular moderada, se justifica porque alguns fatores estão muito bem determinados na literatura, tais como o protocolo de anestesia e os protocolos de avaliação motora que foram padronizados e adotadas pelo LETRAN-IOT/FMUSP (Rodrigues, 1999).

O número de animais (n) para a formação dos grupos baseou-se no padronizado pela MASCIS e em pesquisas anteriores, que adotaram modelo experimental semelhante (Cristante et al., 2009a; Marcon, 2006; Santos et al., 2011). Para determinar um critério de inclusão rígido, foi necessário eliminarmos os fatores de interferência, tais como: Animais apresentando fratura ou claudicação em membro pélvico, alteações na deambulação pré lesão medular experimental, raça, sexo, idade diferentes. A homogeneização da amostra é essencial para se obter confiabilidade e reprodutibilidade.

Desde as clássicas publicações de Allen (1911) e Allen (1914), vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para simular a lesão medular produzida por peso em queda livre sobre a medula de animais (Behrmann et al., 1992; Bresnahan et al.,

1987; Ford, 1983; Noble e Wrathall, 1985 e 1987). A obtenção de uma lesão medular moderada sistematizada e homogeneizada, desejada, foi feita através de um equipamento de impacto controlado por microcomputador liberando uma haste com um peso de 10 gramas a uma altura de 12,5 mm Mascis Impactor desenvolvido por **Gruner (1992)** e avaliado e utilizado inicialmente por **Constantini e Young (1994)** e **Basso et al. (1996)**.

Durante a revisão da literatura e após a realização dos experimentos, notamos que o indivíduo com lesão medular realmente sofre danos catastróficos em seu dia a dia.

Inúmeras drogas têm sido pesquisadas, como dexametasona, monossialogangliosídeo GM-1, Metilprednisolona, eritropoetina porém a terapia celular necessita de mais estudos. (**Souza et al., 2011**).

Além disso, é de suma importância entender como a terapia celular interage na lesão medular aguda, por isso a necessidade de novos estudos terapêuticos celulares.

Na lesão da medula espinal, os axônios sofrem degeneração Walleriana distal que compreende quebra e degradação de axônios e bainhas de mielina, bem como apoptose de células gliais, notadamente de oligodendrócitos. Embora no sistema nervoso periférico a regeneração axonal bem sucedida possa seguir a degeneração Walleriana, no SNC mamífero a brotação axonal é transitória e não associada com a regeneração funcional consistente (**Buss et al., 2004**). Em combinação com a degeneração Walleriana, a lesão medular provoca uma cascata de eventos vasculares, bioquímicos e inflamatórios relacionados à ativação de fibroblastos, pericitos, glia, como astrócitos e micróglia. A combinação de lesão neuronal e glia ativada leva a processos patológicos e reparadores endógenos no ambiente da lesão. No entanto, esses processos se associam a cicatrizes fibrogliais, formação de cavidades, diminuição adicional de neurônios e interrupção da condutância neural (**Liu et al., 2022; Wu et al., 2022**).

A regeneração axonal limitada no SNC tem sido atribuída a um desequilíbrio entre fatores promotores de crescimento e inibidores de axônios e entre interleucinas protetoras pró-inflamatórias e neuronais, no microambiente da lesão (**Fu et al., 2022; Orr e Gensel, 2018**). Portanto, múltiplas linhas de pesquisa visam esclarecer a resposta inflamatória e os papéis do microbioma e do controle mitocondrial do estresse oxidativo na patogênese da lesão medular, tentando isolar fatores específicos que podem ser empregados translacionalmente em futuras terapias (**Orr e Gensel, 2018**). Além disso, os benefícios dos enxertos de CT e biológicos (*scaffolding*), juntamente com a caracterização do

secretoma dessas células, foram explorados como alvos terapêuticos adjuvantes de lesão medular (**Wu et al., 2022**).

6.1 Células-tronco

As Ct têm a capacidade de se auto-renovar, proliferar e se diferenciar em tipos específicos de células e podem ser amplamente classificadas com base em seu potencial de diferenciação como CT totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As CT totipotentes, que são o zigoto e os blastômeros iniciais, têm a capacidade de gerar todos os tipos de células do organismo, incluindo células extra-embrionárias. As CT embrionárias, células da massa interna do blastocisto, são CT pluripotentes capazes de originar células das três camadas germinativas. Um tipo de CT pluripotente adicional é a CT pluripotente induzido derivado *in vitro* de células somáticas pela expressão heteróloga de fatores de reprogramação definidos. Finalmente, as CT multipotentes podem se diferenciar em um número limitado de células da mesma linhagem de tecido (**da Silva Siqueira et al., 2021**).

As CT multipotentes do indivíduo adulto ou jovem pós-natal podem ser isoladas e cultivadas, sem a modificação genética necessária à obtenção de células iPSC. Embora as CT multipotentes tenham a limitação de não se manterem em cultura por muitas passagens (cerca de seis a sete), elas são mais facilmente obtidas do que as CT embrionárias (pluripotentes) e não apresentam impedimento ético significativo.

Anteriormente ao presente trabalho, neuroesferas haviam sido cultivadas após dissecação do prosencéfalo de ratos em E14 (vesículas telencefálicas, **Marín 2012**), um protocolo com mais elevado rendimento do que a partir de ratos em P1-P2 (córtex cerebral). No sétimo DIV, as neuroesferas das vesículas telencefálicas em E14 mostram-se positivas para nestina, um filamento intermediário e marcador para células progenitoras neurais (**Lendahl et al., 1990**). Após tratamento para diferenciação neuronal por 7 DIV, as células periféricas da neuroesfera apresentam alterações morfológicas, revelando corpos celulares em formato triangular e processos longos e finos. Essas células expressam marcadores neuronais, como o característico filamento intermediário neuronal de cadeia leve, NFL (**Marín 2012**). Em geral, a análise de imunofluorescência dos marcadores celulares confirmou que as células flutuantes obtidas *in vitro* a partir das vesículas telencefálicas de ratos em E14 apresentaram fenótipo indiferenciado, bem como potencial de diferenciação em células com propriedades de expressão morfológica e

genética características de células neurais. Para o protocolo de tratamento de diferenciação neuronal, as lamínulas foram revestidas com PDL. Lamínulas revestidas com laminina também foram usadas no mesmo protocolo de neuroesfera para diferenciação neuronal 2D, produzindo células com longos processos que se alongavam para longe do corpo celular, conforme observado em microscopia óptica de campo claro. Além disso, a laminina foi usada na cultura 3D em forma de Matrigel[®], um produto enriquecido com laminina obtido a partir da purificação da membrana basal de tumores de ratos. Processos celulares alongados foram observados em alta densidade após 1 DIV a 5 DIV de cultura 3D de neuroesferas obtidas a partir de vesículas telencefálicas de ratos em E14 embebidas em Matrigel[®].

Optamos por iniciar experimentação em terapia celular no nosso modelo cirúrgico experimental com neuroesferas de telencéfalo de rato neonato (P1), por se tratar da mesma espécie, ser pós-natal e em período precoce, ainda gerar *in vitro* um número de neuroesferas apropriado à experimentação. As neuroesferas cultivadas a partir de zona subventricular de ratos em P1/2 tiveram progressão temporal da diferenciação semelhante às esferas cultivadas a partir de embrião de rato. Em estudos anteriores, notamos as seguintes diferenças durante o cultivo em suspensão. Uma vez que o número de progenitores é consideravelmente menor em P1/2 do que ao final do segundo terço de gestação (E14), foi necessário o dobro de tempo para obtenção das neuroesferas para diferenciação. Mesmo assim, obtivemos um número menor do que a partir do embrião, mas suficiente para os grupos experimentais. Em P3 há muitas células diferenciadas em relação a E14. Assim, após uma semana, dissociamos as células de neuroesferas e as recultivamos em meio de manutenção. Foram testados os dois revestimentos: poli-D-lisina (PDL, sintético) com ou sem laminina para diferenciação neuronal. Laminina está contida em Matrigel[®], uma vez que este é purificado de lâmina basal.

6.2 Enxertos de neuroesferas em lesão experimental da medula espinal torácica de ratos

Na lesão medular em humano, a deposição de uma cicatriz densa e a perda de uma estrutura astrogliar orientada apontam para um ambiente não favorável para o crescimento de fibras nervosas (Buss et al., 2004). Portanto, diversas CT e materiais *scaffolding* foram testados para melhorar a capacidade regenerativa da medula espinal se recuperando de

lesões. Geralmente, é desafiador integrar dados de estudos que visam o transplante de CTN em modelos experimentais de lesão medular em ratos, devido a lesões medulares contusivas em diferentes níveis e profundidades, células de diversas origens e vias de administração distintas, alternativas de *scaffolding* e desfechos pós-operatórios. Estudos sobre o transplante de CTN geneticamente não modificadas para rato com lesão medular contusiva com o objetivo de avaliar o resultado da função motora foram relatados (Trujillo et al., 2009).

6.3 Modelos de lesão contusiva da medula espinal torácica

O transplante de neuroesferas da medula espinal de ratos E14 nove dias após a lesão medular contusiva no nível cervical (C4–C5) melhorou as pontuações dos testes comportamentais dos animais com base na frequência de ingestão de pellets. Este foi um dos primeiros experimentos demonstrando que o enxerto de uma população enriquecida com CTN, através da formação de neuroesferas, em rato adulto com lesão medular resulta na geração *in vivo* de novos neurônios a partir de células transplantadas (Ogawa et al., 2002).

As neuroesferas pós-natais da zona subventricular de rato do prosencéfalo correspondente ao córtex cerebral profundo periventricular foram usadas como enxertos sem *scaffolding* uma semana após a lesão contusiva de rato no nível T9 ter sido produzido por um peso de 25 mm do NYU-Impactor. Esse delineamento experimental foi majoritariamente semelhante ao nosso, embora não tenha sido empregado o *scaffolding*, o transplante celular estava em fase subaguda pós-lesão e a lesão contusiva era duas vezes mais intensa do que a definida em nosso estudo. Doze semanas após o transplante, os animais que receberam neuroesferas da zona subventricular do prosencéfalo divulgaram pontuações mais altas de BBB do que o controle ou animais que tinham CT mesenquimais de medula óssea ou origens de tecido adiposo (Zhang et al., 2009). O maior escore BBB observada na semana 12 (média de 13,8 para o grupo da neuroesfera do prosencéfalo; Zhang et al., 2009) foi próxima ao nosso escore BBB do grupo 5 na S6 (média de 13,7). Em nosso estudo, dois fatores importantes relacionados ao enxerto de CTN deveriam ter antecipado a recuperação da função motora: a presença de Matrigel® e o transplante celular na fase aguda da cicatrização da lesão.

Outro estudo utilizou transplante de neuroesfera de prosencéfalo de rato E16.5 uma semana após a lesão contusiva moderada em T9–T10. Não houve diferenças estatisticamente significativas no escore BBB entre os grupos ou ao longo das seis semanas de acompanhamento (McMahon et al., 2010). Este estudo corrobora o de Zhang et al. (2009) ao não mostrar melhora significativa da função motora seis semanas após o transplante de CTN que ocorreram em fase subaguda após a lesão contusiva. Em um modelo de lesão contusiva no nível da última vértebra torácica do rato após laminectomia e durotomia, as CTN derivadas como neuroesferas da medula espinal fetal humana foram transplantadas subagudamente (nove dias após a cirurgia) e a função motora avaliada pelo escore BBB foi significativamente maior após 18 semanas quando comparada ao controle.

Em nosso estudo, os animais que não receberam células, mas Matrigel® (grupo 2), células indiferenciadas sem Matrigel® (grupo 4) ou células que estiveram em cultura 3D por 24 horas antes da cirurgia (grupo 6) aumentaram significativamente os escores BBB entre a terceira e sexta semanas após a cirurgia, quando comparados individualmente àqueles com lesão contusiva, mas sem tratamento (grupo 1). Notavelmente, aqueles que receberam células indiferenciadas misturadas com Matrigel® imediatamente antes da cirurgia (grupo 5) foram significativamente melhores do que qualquer outro grupo no mesmo período (S3–S6). Os animais dos grupos 2 e 5 melhoraram mais cedo a função motora ao longo do período pós-operatório, o que pode ter melhorado sua capacidade e vontade de se alimentar, levando ao ganho de peso corporal semelhante ao grupo 3 (sham). Nossa impressão geral de menos necrose e glóbulos brancos no tecido nos grupos 2 e 5, embora sem significância estatística, também pode estar relacionada a um resultado funcional anterior. Essas evidências e a presença de Matrigel® recém-gelificado no sítio de enxerto de animais dos grupos 2 e 5 apoiam a ação terapeuticamente adjuvante deste *scaffolding*.

Em um estudo recente, as neuroesferas de passagem 3 do hipocampo de ratos recém-nascidos transplantados em uma mistura fresca com Matrigel® uma semana após a indução da lesão contusiva moderada (T10) melhoraram a função motora avaliada pela escala BBB entre a segunda e a nona semanas de acompanhamento. Embora o Matrigel® sozinho tenha melhorado os escores BBB em comparação com o controle, os valores não foram estatisticamente diferentes. O estudo indica que o Matrigel® contribui para a diferenciação celular, sobrevivência e adesão *in vitro* e *in vivo* (Wang et al., 2020).

Acredita-se que as terapias baseadas em células para a lesão medular relatando ganho funcional na recuperação pós-operatória medeiam um efeito parácrino secretando fatores tróficos que sinalizam para o microambiente da lesão. De fato, mudanças na expressão gênica nos níveis de mRNA e proteína foram observadas no local da lesão alguns dias a semanas após o transplante de CTN (**Hawryluk et al., 2012**). Essas observações sugerem que um conjunto de fatores secretados, incluindo moléculas pequenas solúveis e longas cadeias de componentes da matriz extracelular, desempenha papéis na mediação da cura e reparo bem-sucedidos do sítio da lesão medular (**Wu et al., 2022**). Nossos resultados que demonstram a superioridade da combinação entre Matrigel® e CTN indiferenciadas na recuperação motora após lesão contusiva apoiam a ideia de um efeito parácrino.

A escala de avaliação da recuperação funcional de BBB (**Basso et al., 1995**) é a principal escala utilizada para quantificar a recuperação motora em ratos com lesão medular, que segue estudos realizados pelo MASCIS. A avaliação pela escala funcional BBB é tida como válida, reprodutível e permite a comparação de resultados e troca de experiências (**Santos et al., 2011**).

As avaliações foram realizadas de forma cega, os pesquisadores que aplicaram a escala funcional BBB, a pesquisadora que realizou a análise histológica e o estatístico que analisou os dados obtidos eram cegos quanto a que grupo pertencia cada animal.

A avaliação dos ratos imediatamente após a contusão medular, confirma se foi efetiva, causando paresia de membros pélvicos. A manutenção da avaliação nas semanas seguintes durante 6 semanas, permite a avaliação em longo prazo até o que se atinja um platô, avaliando todos os aspectos da sequência de eventos ocorridos após o trauma raquimedular, podendo realizar avaliação de forma homogênea em todos animais. Dessa maneira, pôde-se observar e comparar a progressão dos resultados até a sua estabilização (patamar definitivo).

Quanto aos nossos resultados, na avaliação BBB os grupos 2, 4 e 6 não diferiram em média estatisticamente entre si ($p > 0,05$), mas os demais grupos diferiram em média estatisticamente ($p < 0,05$), sendo o grupo 5 com maior valor de BBB e o grupo 1 com o menor valor independente de ser na terceira ou sexta semana de avaliação, já da terceira para a sexta semana houve aumento médio de 4,72 pontos estatisticamente significativo do BBB independente do grupo ($p < 0,001$).

Os parâmetros histológicos de necrose e presença de eritrócitos foram classificados em quatro graus de acordo com a frequência de sua observação em tecido medular corado por hematoxilina-eosina. Os graus (Gr0, Gr1, Gr2 e Gr3) correspondiam, respectivamente, à ausência, presença discreta, moderada ou acentuada. O terceiro parâmetro analisado (presença de leucócitos) foi classificado de Gr0 a Gr2. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Todavia, a presença de necrose e leucócitos foi, de modo geral, mais discreta a ausente no grupo 5, em comparação aos outros grupos de animais submetidos à contusão medular. Este estudo se fez necessário para certificação de que o traumatismo fora efetivo na produção da contusão medular.

Comparando nossos resultados com outros trabalhos semelhantes, vimos que **Albin e White (1987)** demonstram que o traumatismo da medula espinal, além da destruição mecânica, desencadeia hemorragia, diminuição da perfusão, hipóxia tecidual, edema e, finalmente, necrose dos elementos neurais. Nossos achados foram semelhantes na avaliação histológica, todos os grupos submetidos à contusão medular apresentaram algum grau de alteração morfológica.

Ainda comparando com nosso estudo, na mesma linha de pesquisa, **Skardelly et al. (2011)** estudaram o transplante experimental de células progenitoras neurais fetais humanas (hfNPC), que provou ser uma abordagem terapêutica promissora após lesão cerebral traumática por TCE. No entanto, a eficácia e a segurança a longo prazo de ambas as terapias altamente importantes para a tradução clínica desta abordagem até agora não foram investigadas. Esse estudo investigou o efeito de células locais (L, 1×10^5) e administração sistêmica (S, 5×10^5 células) de PKH-26 marcado hfNPCs pré-diferenciados durante um período de 12 semanas, começando 24 h após grave TCE de impacto cortical controlado em ratos Sprague-Dawley. Acelerando a haste rotativa, testes revelaram uma tendência de melhora funcional começando uma semana após o transplante e persistindo até o final do experimento. O grau de contusão foi quantificado por ressonância magnética e mostrou ser menor em ambos os grupos de tratamento em comparação com animais de controle (C) (C = 54,50 mm(3), L = 32 mm(3), S = 37,50 mm(3)). Correspondentemente, a coloração neuronal (NeuN) mostrou aumento de sobrevivência neuronal na borda da lesão em ambos os grupos transplantados (S = 92,4%; L = 87,2%; 72,5%). Análise histológica dos compartimentos cerebrais revelou aumento transitório da angiogênese e redução da reação astrogliar durante as

primeiras quatro semanas pós-transplante. As células positivas para PKH-26 foram detectadas exclusivamente após transplante local, sem qualquer evidência de formação de tumor. No entanto, a diferenciação do enxerto foi observada apenas em casos muito raros. Em conclusão, o transplante de hfNPCs melhorou o resultado funcional a longo prazo após TCE, com diminuição do tamanho da lesão traumática e aumento da sobrevivência neuronal na zona limítrofe da lesão. Esse efeito terapêutico provavelmente não foi devido à substituição celular, mas foi associado com um aumento transitório da angiogênese e uma astrogliose reduzida. A ciência está desvendando os mecanismos de neuroproteção e neuroregeneração, mas clinicamente ainda está somente oferecendo tratamento de suporte para os pacientes com lesão medular. Ainda é desafiador encontrar tratamento que melhore a recuperação funcional de pacientes lesados medulares.

7 CONCLUSÃO

Gustavo Bispo dos Santos

7 CONCLUSÃO

Os animais que tiveram aplicadas as neuroesferas indiferenciadas com Matrigel® na lesão medular moderada, apresentaram melhora na função motora após seis semanas.

8 REFERÊNCIAS

Gustavo Bispo dos Santos

8 REFERÊNCIAS

Alexander MS, Biering-Sorensen F, Bodner D, Brackett NL, Cardenas D, Charlifue S, et al. International standards to document remaining autonomic function after spinal cord injury. *Spinal cord*. 2009;47(1):36–43.

Albin MS, White RJ. Epidemiology, physiopathology, and experimental therapeutics of acute spinal cord injury. *Crit Care Clin*. 1987;3(3):441–52.

Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. *JAMA*. 1911;57(11):878–80.

Allen AR. Remarks on histopathological changes in spinal cord due to impact: an experimental study. *J Nerv Ment Dis*. 1914;41(3):141–7.

Amador MJ, Guest DG. An appraisal of ongoing experimental procedures in human spinal cord injury. *J Neurol Phys Ther*. 2005;29(2):70–6.

Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 1999;44(5):1027–39.

Anderson DK, Means ED, Waters TR, Green ES. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg*. 1982;56(1):106–13.

Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, et al. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1985;2(4):257–67.

Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma: I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest*. 1978;39(3):236–53.

Barros Filho TEP, Taricco MA, Oliveira RP, Greve JM, Santos LCR, Napoli MMM. Estudo epidemiológico dos pacientes com traumatismo da coluna vertebral e déficit neurológico, internados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1990;45(3):123–6.

Basso DM, Bresnahan JC, Beattie MS. Incomplete recovery after spinal cord contusion is associated with a nearly complete loss of vestibulospinal system (VSS) and long descending propriospinal neurons (LDPN) in rats. *Soc Neurosci*. 1993;19:541.

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.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996;139(2):244–56.

Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. A review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2000;17(10):915–25.

Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma*. 1992;9(3):197–217.

Blight AR. Cellular morphology of chronic spinal cord injury in the cat: analysis of myelinated axons by line-sampling. *Neuroscience*. 1983;10(2):521–43.

Blight AR, Zimmer MP. Acute spinal cord injury: pharmacotherapy and drug development perspectives. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001;2(6):801–8.

Bracken MB, Shepard MJ, Hellenbrand KG, Collins WF, Leo LS, Freeman DF, et al. Rifkinson N. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury—Results of the National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg.* 1985;63(5):704–13.

Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, et al. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1- year follow-up data. Results of the second National Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg.* 1992;76(1):23–31.

Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg.* 1993;79(4):500–7.

Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA.* 1997;277(20):1597–604.

Bracken MB, Sheopard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow-up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. *J Neurosurg.* 1998;89(5):699–706.

Bracken MB. Pharmacological interventions for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;2:CD001046.

Bracken MB. Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S47–54.

Braughler JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg.* 1983;59(2):256–61.

Bregman BS, McAtee M, Dai HN, Kuhn PL. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol.* 1997;148(2):475–94.

Bresnahan JC, Beattie MS, Todd FD 3rd, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol.* 1987;95(3):548–70.

Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, Marcillo A, Quencer RM. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol.* 1993;59:75–89.

Buss A, Brook GA, Kakulas B, Martin D, Franzen R, Schoenen J, et al. Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain.* 2004;127(Pt 1):34–44.

Chen A, Xu XM, Kleitman N, Bunge MB. Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol.* 1996;138(2):261–76.

Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg.* 1994;80(1):97–111.

Cristante AF, Tsanaclis AM, Santos CV, Barros EMKP, Marcon RM, Oliveira RP, et al. Estudo do implante e viabilidade de células do sistema nervoso central fetal no tratamento da lesão de medula espinal em ratos. *Folha Ortop Traumatol.* 2002;11(34).

Cristante AF, Barros Filho TEP, Oliveira RP, Marcon RM, Rocha ID, Hanania FR, et al. Daci K. Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2009a;47(6):458–63.

Cristante A F, Barros Filho TEP, Tetsui N, Mendroni A, Caldas JG, Camargo AJS, et al. Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. *Spinal Cord*. 2009b; 47(10):733–8.

Cristante AF, Filho TE, Oliveira RP, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB. Effects of antidepressant and treadmill gait training on recovery from spinal cord injury in rats. *Spinal Cord*. 2013;51(6):501–7.

da Silva Siqueira L, Majolo F, da Silva APB, da Costa JC, Marinowic DR. Neurospheres: a potential in vitro model for the study of central nervous system disorders. *Mol Biol Rep*. 2021;48(4):3649–63.

Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature*. 1997;390(6661):680–3.

Debrovner CH. Stem cells, the miraculous cells rooted in controversy [online]. New York: Society for Ethical Culture; 2000. Available from: http://www.nysec.org/addresses/stem_cells.html.

Delamarter RB, Coyle J. Acute management of spinal cord injury. *J Am Acad Orthop Surg*. 1999;7(3):166–75.

De La Torre JC, Johnson CM, Goode DJ, Mullan S. Pharmacologic treatment and evaluation of permanent experimental spinal cord trauma. *Neurology*. 1975;25(6):508–14.

De La Torre JC. Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1981;6(4):315–35.

Dohrmann GJ, Panjabi MM, Wagner FC Jr. An apparatus for quantitating experimental spinal cord trauma. *Surg Neurol*. 1976a;5(5):315–8.

Dohrmann GJ, Panjabi MM. “Standardized” spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. *Surg Neurol*. 1976b;6(5):263–7.

Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J Neurosurg*. 1969;30(6):693–7.

Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg*. 1971;35(6):700–8.

Ducker TB, Salcman M, Perot PL Jr, Ballantine D. Experimental spinal cord trauma, I. Correlation of blood flow, tissue oxygen and neurologic status in the dog. *Surg Neurol*. 1978;10(1):60–3.

Fairholm DJ, Turnbull IM. Microangiographic study of experimental spinal cord injuries. *J Neurosurg*. 1971;35(3):277–86.

Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci*. 1999;19(19):8182–98.

Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 4.ed. Academic Press. 2015.

Ford RWJ. A reproducible spinal cord injury model in the cat. *J Neurosurg*. 1983; 59(2):268–75.

Fu SP, Chen SY, Pang QM, Zhang M, Wu XC, Wan X, et al. Advances in the research of the role of macrophage/microglia polarization-mediated inflammatory response in spinal cord injury. *Front Immunol.* 2022;13:1014013.

Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol.* 1985;88(1):123–34.

Galvão PEC. Avaliação funcional e histológica do efeito da oxigenoterapia hiperbárica em ratos com lesão medular contusa [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

Gamache FW, Myers RAM, Ducker TB, Cowley RA. The clinical application of hyperbaric oxygen therapy in spinal cord injury: a preliminary report. *Surg Neurol.* 1981;15(2):85–7.

Gebrin AS, Cunha AS, Da-Silva CF, Barros Filho TEP. Intervenções farmacológicas no trauma raquimedular: uma nova terapêutica. *Acta Ortop Bras.* 1997a;5(3):123–36.

Gebrin AS, Cunha AS, Da-Silva CF, Barros Filho TEP, Azze RJ. Perspectivas de recuperação do lesado medular. *Rev Bras Ortop.* 1997b;32(2):103–8.

Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal-cord injury: a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *N Engl J Med.* 1991;324(26):1829–38.

Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D. The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl): S87–98.

Goldberger ME, Bregman BS, Vierck CJ Jr., Brown M. Criteria for assessing recovery of function after spinal cord injury: behavioral methods. *Exp Neurol.* 1990;107(2):113–7.

Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA. Veterinary Anesthesia and Analgesia. The fifth Edition of Lumb and Jones. 5.ed. John Wiley & Sons; 2015.

Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1992; 9(20:):123–8.

Haddad LA, Smith N, Bowser M, Niida Y, Murthy V, Gonzalez-Agosti C, et al. The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2002;277(46):44180–6.

Hall ED, Wolf DL, Braugher JM. Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose response and time-action analysis. *J Neurosurg*. 1984; 61(1):124–30.

Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg*. 1992;76(1):13–22.

Hall ED. Pharmacological treatment of acute spinal cord injury: how do we build on past success? *J Spinal Cord Med*. 2001;24(3):142–6.

Hansebout RR, Kuchner EF, Romero-Sierra C. Effects of local hypothermia and of steroids upon recovery from experimental spinal cord compression injury. *Surg Neurol*. 1975;4(6):531–6.

Hawryluk GW, Mothe A, Wang J, Wang S, Tator C, Fehlings MG. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev*. 2012;21(12):2222–38.

Hita RM. Análise funcional e histológica da ação da neurotropina-4 sobre a lesão medular em ratos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Holbach KH, Wassmann H, Linke D. The use of hyperbaric oxygenation in the treatment of spinal cord lesions. *Eur Neurol.* 1977;16(1-6): 213–21.

Holdsworth F. Fractures, dislocations and fracture-dislocations of the spine. *J Bone Joint Surg Am.* 1970;52(8):1534–51.

Hurlbert RJ. The role steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S39–46.

Janssen L, Hansebout RR. Pathogenesis of spinal cord injury and newer treatments. A review. *Spine (Phila Pa 1976).* 1989;14(1):23–32.

Jeffery ND, Blakemore WF. Spinal cord injury in small animals 2. Current and future options for therapy. *Vet Rec.* 1999;145(7):183–90.

Kelly DL Jr, Lassiter KRL, Calogero JA, Alexander E Jr. Effects of local hypothermia and tissue oxygen studies in experimental paraplegia. *J Neurosurg.* 1970;33(5):554–63.

Kelly DL Jr, Lassiter KRL, Vongsvivut A, Smith JM. Effects of hyperbaric oxygenation and tissue oxygen studies in experimental paraplegia. *J Neurosurg.* 1972;36(4):425–9.

Kuchner EF, Hansebout RR. Combined steroid and hypothermia treatment of experimental spinal cord injury. *Surg Neurol.* 1976;6(6):371–6.

Legos JJ, Gritman KR, Tuma RF, Young WF. Coadministration of methylprednisolone with hypertonic saline solution improves overall neurological function and survival rates in a chronic model of spinal cord injury. *Neurosurgery.* 2001;49(6):1427–33.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990;60(4):585–95.

Liu F, Huang Y, Wang H. Rodent Models of Spinal Cord Injury: From Pathology to Application. *Neurochem Res.* 2022. doi: 10.1007/s11064-022-03794–8.

Lohse DC, Senter HJ, Kauer JS, Wohns R. Spinal cord blood flow in experimental transient paraplegia. *J Neurosurg.* 1980;52(3):335–45.

Marcon RM. Estudo experimental da ação da metilprednisolona utilizada antes do traumatismo raquimedular em ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Marín ABS. Capacidade proliferativa in vitro de precursores neuro-gliais, telencefálicos e expressão dos genes 1 e 2 do Complexo da Esclerose Tuberosa (TSC1 e TSC2). [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Martins RS Mario GS, Silva CF, Plese JPP. Mecanismos Básicos Da Regeneração de Nervos: Artigo de Revisão. *Arq Bras Neurocir.* 2005;24(1):20–25.

McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models.* 2. ed. New York: Chapman and Hall; 1989. 511 p.

McMahon SS, Albermann S, Rooney GE, Shaw G, Garcia Y, Sweeney E, et al. Engraftment, migration and differentiation of neural stem cells in the rat spinal cord following contusion injury. *Cytherapy.* 2010;12(3):313–25.

McVeigh JF. Experimental cord crushes with special reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the cords affected. *Arch Surg.* 1923;7(3):573–600.

Means ED, Anderson DK, Waters TR, Kalaf L. Effect of methylprednisolone in compression trauma the feline spinal cord. *J Neurosurg.* 1981;55(2):200–8.

Merola A, O'Brien MF, Castro BA, Smith DA, Eule JM, Lowe TG, et al. Histologic characterization of acute spinal cord injury treated with intravenous methylprednisolone. *J Orthop Trauma.* 2002;16(3):155–61.

Miranda TAB. Estratégia terapêutica após contusão da medula espinhal: recuperação funcional e estabilidade cortical sensório-motora [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol.* 2001;152(4):657–68.

Murthy V, Haddad LA, Smith N, Pinney D, Tyszkowski R, Brown D, et al. Similarities and differences in the subcellular localization of hamartin and tuberlin in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278(5):F737–46.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *applied Linear Statistical Models.* 4. Ed. Illinois: Richard D. Irwing. 1996. 1408 p.

New York University Medical Center. Impactor. NYU Spinal cord contusion system. Operation manual. Impactor software version 7.0. New York; 1993.

Noble LJ, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol.* 1985;88(1):135–49.

Noble LJ, Wrathall JR. An inexpensive apparatus for producing graded spinal cord contusive injury in the rat. *Exp Neurol.* 1987;95(2):530–3.

Nockels R, Young W. Pharmacologic strategies in the treatment of experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 1992;9(Suppl 1):211–7.

Nornes H, Björklund A, Stenevi U. Reinnervation of the denervated adult spinal cord of rats by intraspinal transplants of embryonic brain stem neurons. *Cell Tissue Res.* 1983;230(1):15–35.

Nudi ET, Jacqmain J, Dubbs K, Geeck K, Salois G, Searles MA, et al. Combining Enriched Environment, Progesterone, and Embryonic Neural Stem Cell Therapy Improves Recovery after Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2015;32(14):1117–29.

Orr MB, Gensel JC. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurotherapeutics*. 2018;15(3):541–53.

Park SS, Lee YJ, Lee SH, Lee D, Choi K, Kim WH, Kweon OK, Han HJ. Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells. *Cytotherapy*. 2012;14(5):584–97.

Paschon V, Morena BC, Correia FF, Beltrame GR, Dos Santos GB, Cristante AF, Kihara AH. VDAC1 is essential for neurite maintenance and the inhibition of its oligomerization protects spinal cord from demyelination and facilitates locomotor function recovery after spinal cord injury. *Sci Rep*. 2019;9(1):14063.

Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res*. 1998;58(21):4766–70.

Rahimi-Movaghar V, Sayyah MK, Akbari H, Khorramirouz R, Rasouli MR, Moradi-Lakeh M, et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries: a systematic review. *Neuroepidemiology*. 2013;41(2):65–85.

Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci*. 1998;18(10):3803–15.

Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assesment of motor experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg*. 1977;47(4):577–81.

Rivlin AS, Tator CH. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *J Neurosurg.* 1978;49(6):844–53.

Rodrigues NR. Padronização da lesão medular espinal em ratos Wistar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.

Rossignol S, Schwab M, Schwartz M, Fehlings MG. Spinal cord injury: time to move? *J Neurosci.* 2007;27(44):11782–92.

Salomone R, Bento RF, Costa HJ, Azzi-Nogueira D, Ovando PC, Da-Silva CF, et al. Bone marrow stem cells in facial nerve regeneration from isolated stumps. *Muscle Nerve.* 2013;48(3):423–9.

Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damascen ML. Spinal cord injury experimental model and motion evaluation protocol in wistar rats. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(2):87–91.

Scagliosi G. Beitrag zur pathologischen Anatomie des Centralnervensystems bei der acuten Anämie. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 1898;24(20):309–11.

Schmaus H. Beiträge zur pathologischen Anatomie der Rückenmarkerschütterung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin.* 1890;122(3):470–95.

Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* 1996;76(2):319–70.

Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S2–12.

Short DJ, El Masry WS, Jones PW. High dose methylprednisolone in the management of acute spinal cord injury: a systematic review from a clinical perspective. *Spinal Cord.* 2000;38(5):273–86.

Shroff G. Human Embryonic Stem Cell Therapy in Chronic Spinal Cord Injury: A Retrospective Study. *Clin Transl Sci.* 2016;9(3):168–75.

Singh R, Dhankar SS, Rohilla R. Quality of life of people with spinal cord injury in Northern India. *Int J Rehabil Res.* 2008;31(3):247–51.

Skardelly M, Gaber K, Burdack S, Scheidt F, Hilbig H, Boltze J, et al. Long-term benefit of human fetal neuronal progenitor cell transplantation in a clinically adapted model after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2011;28(3):401–14.

Souza FI, Barros Filho TEP, Cristante AF. Avaliação do emprego do GM1 após lesão medular experimental em ratos [Evaluation of the use of GM1 after experimental spinal cord injury in rats]. *Coluna/Columna.* 2011;10(4):305–8.

Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Johno M. Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J Neurotrauma.* 2001;18(5):533–43.

Tarlov IM, Klinger H, Vitale S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1953;70(6):813–9.

Tator CH, Deecke L. Value of normothermic perfusion, hypothermic perfusion, and durotomy in the treatment of experimental acute spinal cord trauma. *J Neurosurg.* 1973;39(1):52–64.

Tator CH, Rowed IW. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can Med Assoc J.* 1979;121(11):1453–64.

Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.* 1991;75(1):15–26.

Trujillo CA, Schwindt TT, Martins AH, Alves JM, Mello LE, Ulrich H. Novel perspectives of neural stem cell differentiation: from neurotransmitters to therapeutics. *Cytometry A*. 2009;75(1):38–53.

van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, et al. Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet*. 1998;7(6):1053–7.

Vialle LRG, Fischer S, Marcon JC, Vialle E, Luzzi R, Bleggi-Torres LF. Estudo histológico da lesão medular experimental em ratos. *Rev Bras Ortop*. 1999;34(2):85–9.

Wagner FC Jr, Dohrmann GJ, Bucy PC. Histopathology of transitory traumatic paraplegia in the monkey. *J Neurosurg*. 1971;35(3):272–6.

Walker JB, Harris M. GM-1 ganglioside administration combined with physical therapy restores ambulation in humans with chronic spinal cord injury. *Neurosci Lett*. 1993;161(2):174–8.

Wang J, Chu R, Ni N, Nan G. The effect of Matrigel as scaffold material for neural stem cell transplantation for treating spinal cord injury. *Sci Rep*. 2020;10(1):2576.

Way SW, McKenna J 3rd, Mietzsch U, Reith RM, Wu HC, Gambello MJ. Loss of Tsc2 in radial glia models the brain pathology of tuberous sclerosis complex in the mouse. *Hum Mol Genet*. 2009;18(7):1252–65.

Woodard JS, Freeman LW. Ischemia of the spinal cord; an experimental study. *J Neurosurg*. 1956;13(1):63–72.

Wu Y, Tang Z, Zhang J, Wang Y, Liu S. Restoration of spinal cord injury: From endogenous repairing process to cellular therapy. *Front Cell Neurosci*. 2022;16:1077441.

Yao Y, Huang C, Gu P, Wen T. Combined MSC-Secreted Factors and Neural Stem Cell Transplantation Promote Functional Recovery of PD Rats. *Cell Transplant.* 2016;25(6):1101–13.

Yeo JD, Payne W, Hinwood B, Kidman AD. The experimental contusion injury of the spinal cord in sheep. *Paraplegia.* 1975;12(4):279–98.

Yeo, JD, McKenzie B, Hindwood B, Kidman, A. Treatment of paraplegic sheep with hyperbaric oxygen. *Med J Aust.* 1976;1(15):538–40.

Yeo JD, Stabback S, McKenzie B. Central necrosis following contusion to the sheep's spinal cord. *Paraplegia.* 1977;14(4):276–85.

Yoon DH, Kim YS, Young W. Therapeutic time window for methylprednisolone in spinal cord injured rat. *Yonsei Med J.* 1999;40(4):313–20.

Young W, Flamm ES, Demopoulos HB, Tomasula JJ, DeCrescito V. Effect of naloxone on posttraumatic ischemia in experimental spinal contusion. *J Neurosurg.* 1981;55(2):209–19.

Young W, Flamm ES. Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J Neurosurg.* 1982;57(5):667–73.

Young W. MASCIS Spinal Cord Contusion Model. In: Chen, J., Xu, Z.C., Xu, XM., Zhang, J.H. (eds) *Animal Models of Acute Neurological Injuries.* Springer Protocols Handbooks. Humana Press. 2009. 411–21 p.

Zhou P, Guan J, Xu P, Zhao J, Zhang C, Zhang B, Mao Y, Cui W. Cell Therapeutic Strategies for Spinal Cord Injury. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2019;8(11):585–605.

Zhang HT, Cheng HY, Cai YQ, Ma X, Liu WP, Yan ZJ, et al. Comparison of adult neurospheres derived from different origins for treatment of rat spinal cord injury. *Neurosci Lett.* 2009;458(3):116–21.



9 ANEXO

Gustavo Bispo dos Santos

ANEXO

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 21/06/16, **APROVOU** o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº 042/14 intitulado “Estudo do uso da célula tronco de linhagem neuronal no tratamento da lesão medular aguda” apresentado pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia

- Substituição do pesquisador executante de Paulo Alvim Borges para Gustavo Bispo dos Santos

Pesquisador Responsável: Alexandre Fogaça Cristante

CEUA-FMUSP, 21 de Junho de 2016



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

Gustavo Bispo dos Santos