RENATO ZONZINI BOCABELLO

**O uso da condroitinase ABC combinada com células-tronco do
epitélio olfatório de coelhos em modelo de lesão medular por
hemissecção dorsal em coelhos**

São Paulo
2013

RENATO ZONZINI BOCABELLO

**O uso da condroitinase ABC combinada com células-tronco do
epitélio olfatório de coelhos em modelo de lesão medular por
hemissecção dorsal em coelhos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Anatomia dos Animais
Domésticos e Silvestres da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo
2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

16/5/13

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2789
FMVZ

Bocabello, Renato Zonzini

O uso da condroitinase ABC combinada com células-tronco do epitélio olfatório de coelhos em modelo de lesão medular por hemisseção dorsal em coelhos / Renato Zonzini Bocabello. -- 2013.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Lesão medular. 2. Condroitinase ABC. 3. Células-tronco. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "O uso da condroitinase ABC combinada ou não às células tronco do epitélio olfatório de coelhos em modelo animal de lesão medular por hemisseção dorsal em coelhos", protocolado sob o nº 2372/2011, utilizando 9 (nove) coelhos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research "The use of chondroitinase ABC combined or not with rabbit olfactory stem cells in rabbit model of spinal cord injury by dorsal hemisection", protocol number 2372/2011, utilizing 9 (nine) rabbits, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 21 de maio de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BOCABELLO, Renato Zonzini

Título: O uso da condroitinase ABC combinada com células-tronco do epitélio olfatório de coelhos em modelo de lesão medular por hemisseção dorsal em coelhos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha família, pelo apoio, carinho e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, pela confiança, incentivo e oportunidade de ingressar na carreira científica. Agradeço sua paciência e amizade. Muito obrigado, sem seu apoio meu sonho não se tornaria possível.

A equipe da clínica Nato Medicina Veterinária pela ajuda, principalmente a Juliana C. Monteiro pelos procedimentos anestésicos e cuidados com os animais do experimento.

Aos funcionários Maicon, Jaqueline, Rose Eli e Ronaldo, pela amizade e convivência durante esse tempo, os quais possibilitaram a realização deste projeto.

Aos amigos Thais, Dilayla, Ana Mançanares, Matheus e Sarmiento pela ajuda, durante esse projeto.

RESUMO

BOCABELLO, R. Z. **O uso da condroitinase ABC combinada com células-tronco do epitélio olfatório de coelhos em modelo de lesão medular por hemissecção dorsal em coelhos.** [The use of chondroitinase ABC combined with rabbit olfactory stem cells in rabbit model of spinal cord injury by dorsal hemisection]. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Cerca de 0,005% da população mundial sofre de lesão medular. O processo regenerativo do tecido nervoso apresenta limitada capacidade para repor as células danificadas (JOHANSSON et al., 1999) e produzir inibidores de crescimento dos axônios associados com a mielina para formação de cicatriz glial (OLSON, 2002). Apesar de resultados promissores, ainda existem controversas quanto ao uso de células-tronco. A eliminação da cicatriz glial, os benefícios de sua formação em diferentes fases e a avaliação da liberação de inibidores de crescimento axonal podem ser parâmetros de análise para o tratamento medular. A enzima condroitinase ABC atua nessa lesão. Neste trabalho avaliamos a interrupção do processo de liberação de inibidores axonais da cicatriz da glia em um tempo não agudo de 7 dias da lesão, sem descartar seus benefícios na fase de formação. Nosso objetivo foi utilizar terapia celular e estabelecer um protocolo de tratamento eficaz, criando uma linha de pesquisa nos estudos da lesão medular. Foi utilizado um grupo de coelhos experimental com realização de hemissecção dorsal e instituído o uso da condroitinase ABC, por aplicação, com micro injeção a curto prazo da lesão. Foi aplicada célula-tronco mesenquimal no foco da lesão após o tratamento da cicatriz da glia com a enzima. Avaliamos por imunohistoquímica a liberação de *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) e sulfato de condroitina proteoglicano (SCPg) nos tecidos após o tratamento no qual foi pretendido fechar algumas lacunas e evitar falhas já descritas, e abrir uma nova esperança no tratamento de pacientes com lesão medular. Nossos resultados ainda mostraram um entendimento superficial sobre a enzima e sua ação sobre cicatrização da glia em associação com o implante celular. Foi aberta uma nova linha de questionamento sobre os benefícios causados à regeneração medular previamente a aplicação de células-tronco.

Palavras-chave: Lesão medular. Condroitinase ABC. Células-tronco.

ABSTRACT

BOCABELLO, R. Z. The use of chondroitinase ABC combined with rabbit olfactory stem cells in rabbit model of spinal cord injury by dorsal hemisection. [O uso da condroitinase ABC combinada com células-tronco do epitélio olfatório de coelhos em modelo de lesão medular por hemissecção dorsal em coelhos]. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Around 0,005% of global human population is affected by Spinal Cord Injury (SCI). The regenerative process of neural tissue shows a limited capacity to replace damaged cells (JOHANSSON et al., 1999) and to produce growth inhibitors of associated axons with myelin to create glial scar (OLSON, 2002). Plenty of studies are being developed with stem cell and, despite successful results, there still are controversial opinions. The elimination of the glial scar, the benefits of its growth at different stages and the assessment of axonal growth inhibitors' release can be parameters of analysis for treating spinal cord. The enzyme chondroitinase ABC acts in this lesion. In this paper we evaluated the release interruption of axonal inhibitors of glial scar in a non-acute 7 days term from injury, not disregarding its benefits during growth. Our goal was to use cell therapy and establish an effective treatment protocol, creating a research line for studies of spinal cord injury and its treatment. A group of rabbits was used under experimental model, conducting dorsal hemisection and application of chondroitinase ABC with micro injection in short-term injury. Mesenchymal stem cells were applied in the lesion focus after the glial scar treatment with the enzyme. Immunohistochemically, we evaluated the release of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and sulfate chondroitin proteoglycan (SCPg) in tissues after treatment which was intended to close some gaps and avoid failures described above, and open a new hope in the treatment of patients with spinal cord injury. Our results also showed superficial understanding of the enzyme and its action on glial scarring in association with cell implant. It has opened a new line of questioning about the benefits due to spinal cord regeneration prior to application of stem cells.

Key-words: Spinal cord injury. Chondroitinase ABC. Stem cells.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	14
2.1	GERAL	15
2.2	ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	LESÃO ESPINHAL E LESÃO MEDULAR	17
3.2	APLICAÇÃO DA TERAPIA CELULAR NA LESÃO MEDULAR	20
4	MATERIAIS E MÉTODO	22
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	23
4.2	PROTOCOLO ANESTÉSICO CIRURGICO	24
4.3	APLICAÇÃO DA CONDROITINASE ABC E CELULA-TRONCO NO FOCO DA LESÃO	27
4.4	EUTANASIA DOS COELHOS E COLETA DO MATERIAL PARA HISTOLOGIA	28
4.4.1	Técnica de coloração com Hematoxilina e eosina	30
4.4.2	Identificação da Proteína Verde Fluorescente (Green Fluorescent Protein – GFP) e da expressão de Glial Fibrillary Acid protein (GFAP) e de Sulfato de Condroitina Proteoglicano (SCPg) na Lesão Medular de Coelhos	30
5	RESULTADOS	32
5.1	ANALISE HISTOLOGICA DOS COELHOS SUBMETIDOS A HEMISSECÇÃO MEDULAR	33
5.2	ANALISE IMUNOHISTOQUÍMICA	37
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Somente nos Estados Unidos as lesões medulares afetam de 3 a 5 pessoas em cada 100000, com números bastante similares em outros países (OLSON, 2002). Durante muitas décadas os lesados medulares não tinham esperança de tratamento. Porém, nos anos 90 neurologistas iniciaram o tratamento destas lesões com o uso de esteróides e drogas antiinflamatórias não esteroidais, entretanto observaram-se uma melhora muito reduzida em poucos casos (NESATHURAI, 1998).

O processo regenerativo de danos sofridos ao sistema nervoso central (SNC), e em especial a medula espinhal, apresenta alguns fatores limitantes, tais como a capacidade limitada do SNC em repor as células danificadas (JOHANSSON et al., 1999) e a produção de inibidores de crescimento dos axônios associados com mielina e a formação da cicatriz glial (OLSON, 2002).

A cicatriz glial é predominantemente composta de astrócitos reativos, micróglia/macrófagos e moléculas da matriz extracelular, especialmente de sulfato de condroitina proteoglicana (SCPG) (ROLLS et al., 2008). Os efeitos inibitórios do tecido cicatricial são considerados como o principal empecilho a regeneração do tecido nervoso. Vários trabalhos demonstram a utilização de substâncias e enzimas que eliminam ou reorganizam a cicatriz glial e também com ressecção cirúrgica da cicatriz da glia, onde têm se destacado o uso da condroitinase ABC, uma substância que atua principalmente na eliminação da cicatriz da glial, em qualquer época da sua formação (JONES et al., 2003; ROLLS et al., 2008; SHIELDS et al., 2008; TOM; HOULÉ, 2008; RASOULI et al., 2009).

Em tratamento em lesados medulares, o principal objetivo é a eliminação da cicatriz glial, entretanto o seu estudo apresenta algumas lacunas importantes. Até o presente momento a cicatriz glial era tida como uma barreira a ser eliminada, devido à produção de inibidores de crescimento axonal importantes no processo de regeneração do SNC. Porém, Rolls, Schechter e Schwartz (2009) demonstram diversos benefícios diretos ao processo de regeneração medular através da formação da cicatriz glial em uma primeira etapa, e poucos efeitos deletérios da cicatriz glial em uma segunda etapa, relacionados principalmente com a produção de hormônios inibitórios.

Diversos inibidores de crescimento axonal já foram identificados acompanhando a lesão medular. As proteínas mais conhecidas derivadas de mielina são o NOGO A, *myelin-associated glycoprotein* (MAG) e a *oligodendrocyte myelin glycoprotein* (OMG) (CARONI; SCHWAB, 1988; MCKERRACHER et al., 1994; GRANDPRE; STRITTMATTER, 2001). Estes são inibidores que estão associados à formação da cicatriz glial acompanhando o processo de lesão medular. A principal função destes inibidores junto com a cicatriz glial, é realizar barreira para a regeneração do SNC em especial da medula espinhal. Tais inibidores possuem o sítio de atuação, o Nogo 66, também conhecido como *Nogo Receptor* (NgR) (FOURNIER et al., 2001).

Um grande número de estudos tem sido realizado com células-tronco de diferentes fontes em diferentes modelos animais de lesão medular (IWANAMI et al., 2005; LEE et al., 2007; LIM et al., 2007), mas apesar dos resultados em animais parecerem bastante promissores, as tentativas terapêuticas em humanos apresentam resultados de mínima melhora clínica, ou bastante controversos (MACKAY-SIM et al., 2008).

Portanto o presente estudo tem como objetivo estabelecer um protocolo para a lesão medular espinhal que transponha a cicatriz glial sem excluir seus efeitos benéficos para a regeneração do SNC em um modelo de hemiseção medular em coelho.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estabelecer um protocolo para a lesão medular espinhal que transponha a cicatriz glial sem excluir seus efeitos benéficos para a regeneração do SNC em um modelo de hemissecção medular em coelho.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1- Analisar histologicamente a produção da cicatriz glial através da deposição do sulfato de condroitina proteoglicano em modelo animal experimental.
- 2- descrever a técnica cirúrgica por hemissecção dorsal.
- 3- analisar a lesão medular (LMI) por hemissecção dorsal em coelhos histologicamente com a técnica de hematoxilina e Eosina e Picrossírius.

3 REVISAO DE LITERATURA

3.1 LESÃO MEDULAR E MEDULA ESPINHAL

A medula espinhal se localiza no interior do canal vertebral e possui raízes ventrais (motoras) e dorsais (sensitivas) (LECOUTEUR; CHILD, 1992; FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010). Pode ser dividida em quatro porções: a cervical, composto pelos cinco primeiros segmentos cervicais (C1-C5), a cervicotorácica ou intumescência cervical (C6-T2), a toracolombar (T3-L3), e a lombossacral ou intumescência lombar (L4-S3) (FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010). Os cães possuem 26 discos intervertebrais presentes nos corpos das vertebrae com exceção do espaço entre o atlas e o axis, e na região sacral (FERNÁNDEZ; BERNARDINI 2010). É composto por um núcleo pulposo interno, formado por uma substância gelatinosa e por um anel fibroso externo formado por um material fibrocartilaginoso e fibras elásticas (JOHNSON et al., 1984; COLE et al., 1985; BRAY; BURBIDGE; 1998; COSTA, 2001). A principal função do núcleo é amortecer os impactos na coluna vertebral (COLE et al., 1985).

Os discos intervertebrais permitem o movimento, minimizando e absorvendo os impactos e unindo segmentos da coluna vertebral. Caso ocorra uma compressão do disco, o choque é absorvido pelo deslocamento do núcleo em todas as direções e pela distensão do anel de forma que as forças são dissipadas sobre a área aumentada do anel e placas terminais cartilaginosas (TOOMBS; BAUER, 1995).

A lesão medular é uma doença que afeta de forma considerável tanto humanos como os animais, não apenas no aspecto físico, mas também psicológico.

De três a cinco pessoas em cada 100.000, são acometidas por esse mal, anualmente (OLSON, 2002) e na medicina veterinária as lesões medulares são frequentes tanto resultantes de traumas como de discopatias (SEIM, 1996).

A lesão medular traumática em cães pode ser resultado de trauma endógeno (Hérnia de disco intervertebral) e exógeno (acidentes com carros). Em ambas, as lesões medulares possuem mecanismos de lesão primário e secundário.

Os mecanismos da lesão primária são resultados da injúria física a medula espinhal, e as mudanças patológicas envolvem lesão axonal, dano mecânico direto as células, e vasos sanguíneos rompidos. Já os secundários envolvem distúrbios eletrolíticos, perda da regulação da pressão local e sistêmica, redução do fluxo sanguíneo da medula espinhal, quebra da barreira hematoencefálica, produção de radicais livres, desequilíbrio das metaloproteinases ativadas e emissão de neurotransmissores citotóxicos (TATOR et al. 1991; KRASSIOUKOV; CLAYDON, 2006).

O processo regenerativo de danos sofridos ao sistema nervoso central (SNC), e em especial a medula espinhal, apresenta alguns fatores limitantes, tais como a capacidade limitada do SNC em repor as células danificadas (JOHANSSON et al., 1999) e a produção de inibidores de crescimento dos axônios associados com mielina e a formação da cicatriz glial (OLSON, 2002) que é constituída predominantemente de astrócitos reativos, micróglia/macrófagos e moléculas da matriz extracelular, especialmente de sulfato de condroitina proteoglicana (SCPG) (ROLLS et al., 2008).

Assim, efeitos inibitórios desta cicatrização são considerados como o principal limitante a regeneração do tecido nervoso. Desta forma, muitos trabalhos tem demonstrado a utilização de substâncias e enzimas que eliminam ou

reorganizam a cicatriz glial, onde tem se destacado o uso da condroitinase ABC que atua principalmente na eliminação da cicatriz da glial (SHIELDS et al., 2008; TOM; HOULÉ, 2008; RASOULI et al., 2009).

Entretanto, também é mostrado que nas duas primeiras semanas após a lesão medular, a cicatriz da glia apresenta importantes efeitos benéficos. (ROLLS et al., 2008). A ação dos astrócitos pode ser importante para limitar a resposta inflamatória, porém, isso pode ser feito a custo de uma rebrota axonal bastante reduzida (OGAWA et al., 2002).

A gravidade da lesão medular depende de vários fatores como a força e quantidade de material herniado, e nas lesões toracolumbares é dividido em grau 1, 2, 3, 4 e 5. No grau 1, os principais sintomas clínicos são a presença de dor e a resistência ao movimento sem sintomatologia neurológica. No grau 2 os pacientes apresentam déficit proprioceptivo bilateral e ataxia do terço superior, enquanto no grau 3 notamos a falta de apoio nos membros. O grau 4 é caracterizado pela ocorrência de paraplegia e o grau 5 por perda da sensibilidade a dor superficial e profunda e alteração na micção.

O tratamento pode ser conservador ou cirúrgico dependendo do grau da lesão e das condições clínicas do paciente. Para os graus 1 e 2 indica-se o tratamento conservador e é baseado principalmente no repouso absoluto do paciente o que acarretaria uma fibrose e cicatrização do material herniado. Animais dos graus 3, 4, 5 e 6 com o aparecimento dos sintomas a menos de 48 horas recebem indicação de tratamento cirurgico, entretanto, pacientes com perda de sensibilidade dolorosa profunda e há mais de 48 horas do trauma não são indicados para cirurgia (KNECHT, 1972; SHARP; WHEELER, 1994; FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010).

3.2 APLICAÇÃO DA TERAPIA CELULAR NA LESÃO MEDULAR

O interesse no estudo das células-tronco (CT) está relacionado com as possibilidades que as mesmas oferecem para a medicina regenerativa, representando uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual, podendo ser aplicadas em terapias para diversas doenças (SCHWINDT et al., 2005). O objetivo da medicina regenerativa é a de substituir ou restaurar a função normal das células, tecidos e órgãos que estão danificados por alguma doença.

As células-tronco utilizadas em transplantes devem ser imunologicamente inertes, possuir rápida expansibilidade em cultivo com sobrevivência em longo prazo e de integração no sítio hospedeiro além de serem propícias a transfecção e expressão de genes exógenos (AZIZI et al., 1998).

Devido ao conhecimento da não regeneração das células nervosas (RAMON; CAJAL, 1928), a terapia direcionada a lesão medular tinha como finalidade diminuir a inflamação causada pela lesão medular aguda (BAPTISTE; FEHLINGS, 2007).

Atualmente vários estudos tem demonstrado o potencial neurogênico das células-tronco em animais com lesão medular (NOSRAT et al., 2001; LIMA et al., 2006; PAUL et al., 2009). Em alguns deles foram notados melhora clínica significativa após a utilização das células-tronco na lesão medular (LEE et al., 2007; LIM et al., 2007; CAO; FENG, 2009).

Segundo Marshall et al. (2006) alguns estudos focam as células-tronco do epitélio olfatório e levantam a hipótese sobre o possível potencial de regeneração axonal e cura de doenças demielinizantes. Mackay-Sim et al. (2008) realizaram

estudos em 12 pacientes humanos com lesão medular crônica, mediante a aplicação de células do epitélio olfatório por via local, sendo que apenas um paciente apresentou alguma melhora clínica. Entretanto, os autores concluíram que o transplante dessas células na medula espinhal é um procedimento factível e seguro, apesar do “n” reduzido.

MATERIAIS E MÉTODO

4 MATERIAIS E MÉTODO

Este experimento está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolado sob o número 2081/2011, tendo sido aprovado em reunião de 16/02/2012.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 9 coelhos da raça nova Zelândia, com idade média de 1 ano, pesando 2,5-3,0 kg. Os animais foram obtidos em granja especializada na produção de animais utilizados em pesquisa experimental (*Granja RG* - Comércio de Produtos Agropecuários Ltda. ME- São Paulo-SP).

Os coelhos foram divididos em 3 grupos experimentais de 3 animais cada. O grupo 1 (G1) foi submetido a lesão medular, sete dias após foram injetados com solução salina fosfatada (PBS) e após sete dias células-tronco do epitélio olfatório de coelhos (r-OESC) e eutanasiados com mais sete dias. O grupo 2 (G2), foi submetido a lesão medular, sete dias depois foi injetada condroitinase ABC e sete dias depois células-tronco por via intramedular e eutanasiados com mais 7 dias de experimento. O grupo 3 (GC), ou grupo controle, após sete dias da lesão medular serão injetados com PBS por via intramedular, e após sete dias nova injeção de PBS seguida de eutanásia com mais sete dias. Em todos os grupos o procedimento de aplicação foi por via intra medular no local da lesão (PBS, condroitinase ABC e célula-tronco) foi guiado por Ultra Sonografia (GE Logic 200).

4.2. PROTOCOLO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO

Os coelhos foram contidos quimicamente com 35 mg/kg de cloridrato de quetamina (KETAMINA AGENER^R) e 2 mg/kg de maleato de midazolam (DORMIUM – UNIÃO QUIMICA) por via intramuscular (IM). Posteriormente os animais foram colocados com o pescoço em retroflexão e intubados com sonda endotraqueal 3,0 sendo mantidos com isoflurano (VETFLUORANO^R-VIRBAC) diluído em O₂ a 100%, em sistema aberto do tipo “baraka”. A veia auricular foi canulada para administração de fluidoterapia intravenosa trans-operatória com solução salina de NaCl a 0,9%. A artéria auricular central também foi canulada para monitoração da pressão arterial média (PAM) dos animais. Logo após tricotomia e antissepsia de rotina uma incisão média da linha dorsal será realizada. A lâmina, processos espinhosos e os processos transversos da vértebra T12 foram delicadamente expostos através de afastamento dos músculos paravertebrais. Dois afastadores auto-estáticos de Gelpi foram utilizados e os processos espinhosos da vértebra T12 foi removido com auxílio de goiva e *drill* pneumático, sendo logo após realizado a laminectomia dorsal da vértebra T12 dando visibilidade à medula espinhal. A dura-máter foi incisada com o auxílio de uma agulha hipodérmica, e a medula seccionada em sua porção dorsal com tesoura de íris. Após a realização da hemissecção medular, a dura-máter foi suturada com pontos simples separados com fio de polipropileno 8-0. Os debris resultantes da lesão foram sugados delicadamente com aspirador cirúrgico. Músculos e tecidos adjacentes foram aproximados com fio absorvível (ácido poliglicólico 3-0). A pele dos animais foi aproximada com pontos simples separados de Nylon 4-0. Todos os animais experimentais tiveram a lesão medular induzida segundo o protocolo descrito. Desta

maneira houve uma incidência muito baixa de pontos hemorrágicos e poucas intercorrências pós-operatória. Para fins de análise neurológica todas as técnicas atingiram o seu objetivo. Os animais tiveram perda total da sensibilidade dos membros pélvicos, incontinência urinária e fecal e presença dos reflexos de retirada (Figuras 1 e 2).

Para analgesia pós-operatória imediata foi utilizado 3 mg/kg de morfina (DIMORF^R – CRISTALIA) por via IM. O pós-operatório tardio consistiu na terapia com antibiótico enrofloxacino (Flotril^R COOPERS) na dose de 10mg/Kg/SID por 7 dias, o antiinflamatório cetoprofeno (KETOFEN^R AGENER) 3mg/Kg/SID por 3 dias e 3mg/Kg/TID de morfina imediatamente após a cirurgia repetida por mais dois dias.

Figura 1 – Fotografias do acesso cirúrgico.

Fonte – Bocabello, R. Z. (2013).

Legenda: Em A - Durotomia e exposição da pia-máter. B- Secção dorsal medular com a utilização de uma tesoura de íris. C- Sutura da dura-máter com fio de polipropileno 8-0 (ETHICON). D- Sutura cutânea com nylon 4-0 (ETHICON) com pontos simples contínuos

4.3. APLICAÇÃO DA CONDROITINASE ABC E DE CÉLULAS-TRONCO NO FOCO DA LESÃO MEDULAR

Após a realização da laminectomia com técnica descrita anteriormente, foi injetada a condroitinase ABC (Sigma-Aldrich) diluída em solução salina na concentração de 200U/ml, em um total de 0,2 ml injetados. As injeções serão realizadas em posição rostral, caudal e no interior da lesão causada.

Figure 2 – Procedimento de aplicação por via intramedular.

Fonte – Bocabello, R. Z. (2013).

Legenda: Em A – Micro injeção da enzima chABC em ependórf. B – Ultra Som guiado, micro injeção da enzima chABC . C- Imagem de Ultra Som

4.4 EUTANÁSIA DOS COELHOS E COLETA DE MATERIAL PARA HISTOLOGIA

Após 15 minutos da administração de 30 mg/kg de cloridrato de cetamina associado a 2 mg/kg de maleato de midazolam, os coelhos tiveram a veia auricular canulada e foram administrados 10 mg/kg de propofol. Logo após foi administrado 10 mL de cloreto de potássio por via intravenosa, até ser constada a total parada cardíaca do coelho. Logo após, o tórax dos coelhos foi aberto, e o ventrículo esquerdo canulado com cateter e o átrio direito aberto com bisturi, sendo perfundido com 500 mL de solução salina aquecida. Após a solução salina sair do átrio direito dos coelhos, de forma a todo o sangue do animal ser retirado, serão administrados 500 mL de solução de paraformaldeído tamponado com pH de 7,4. Em seguida a linha média dorsal é incisada com bisturi, e a coluna vertebral é retirada com auxílio de cisalha. A coluna foi então gentilmente dissecada, e a medula espinhal delicadamente retirada da coluna vertebral e imersa em paraformaldeído a 4% por *overnight*. Em seguida a medula espinhal foi introduzida em sucrose a 30% por até 3 dias. Em todos os grupos, os fragmentos da medula foram coletados de cada animal e fixados em paraformaldeído a 4% durante um período superior a 24 horas (Figura 3). Em seguida, foram desidratados em série crescente de etanol (70 % a 100%) e colocados em xilol para diafanização, utilizando-se procedimento convencional, para inclusão em Paraplast® (Leica/Germany) e foram confeccionados blocos retangulares com base de 3x4 cm. Realizaram-se cortes de 5µm em micrótomo (Leica RM 2065) para obtenção das lâminas, e posteriormente desparafinizados em estufa a 60°C por 2 horas.

Utilizou-se a coloração de Hematoxilina-Eosina e Picrossírius para análise estrutural e das características histopatológicas da medula. As lâminas foram

fotomicrografadas em Microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc, utilizando-se o software Zeiss KS 400.

Figura 3 – Imagens da medula.

Fonte – Bocabello, R. Z. (2013).

Legenda: Em A- Dissecação medular após a infusão de paraformaldeído. B- Visualização da região lesionada. C- Separação do material para emblocamento e análise

4.4.1 Técnica de Coloração com Hematoxilina e Eosina

A técnica de coloração foi realizada para avaliar a qualidade de fixação do material coletado. O tecido foi fixado em paraformaldeído 4% e após o tempo mínimo de 24 horas o tecido foi processado e incluído em parafina. Após o foram realizados cortes de 5µm de espessura e as lâminas obtidas foram incubadas em estufa a 60°C por 2 horas para remoção do excesso de parafina dos cortes. Em seguida as lâminas foram imersas no xilol duas vezes, com duração de cinco minutos cada, desidratadas em séries decrescentes de alcoóis por 3 minutos em cada, imersas em Hematoxilina por cinco minutos, e depois lavadas em água corrente por dez minutos. As lâminas foram coradas em eosina por cinco minutos. Após isso, as lâminas foram passadas para o álcool 90% por cinco minutos também, e imersas duas vezes em álcool 100%, com duração de cinco minutos cada imersão. Por fim, foram imersas duas vezes em xilol, com duração de cinco minutos cada imersão e montadas as lâminas com a fixação da lamínula para análise posterior em microscópio óptico.

4.4.2 Identificação da Proteína Verde Fluorescente (Green Fluorescent Protein – GFP) e da expressão de Glial Fibrillary Acid protein (GFAP) e de Sulfato de Condroitina Proteoglicano (SCPg) na Lesão Medular de Coelhos

A identificação da Proteína Verde Fluorescente (GFP) e da expressão de Glial Fibrillary Acid protein (GFAP) e sulfato de condroitina proteoglicano (SCPg) na medula espinhal de coelhos foi realizada utilizando os anticorpos anti-GFP (Living Colors GFP Monoclonal Antibody – Clontech, cat.# 632375), anti-GFAP (Ac

monoclonal de cam anti-GFAP clone 6F2, DBS) e Anti-Chondroitin Sulfate antibody [CS-56] (ab11570). As secções de 4-5 µm foram desparafinizados em xilol e reidratados em série decrescente de etanol. O desmascaramento antigênico foi realizado pelo aquecimento dos cortes em tampão citrato (0,384g de ácido cítrico monohidratado; 2,352g de citrato de sódio tribásico diidratado; 1L de água destilada, pH 6,0) por 15 minutos em forno de microondas. A atividade de peroxidase tecidual endógena foi bloqueada pela incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em tampão Tris-HCl 1M, pH 7,5 (TBS, 60,57g de Tris para 500 mL de água ultrapura) por 30 minutos. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, os cortes foram incubadas com soro de cabra a 10% em TBS por 30 minutos. O anticorpo primário foi diluído a 1µg/µL em tampão TBS contendo 1% de soro de cabra e incubado “overnight” a 4° C em câmara úmida. Paralelamente, cortes foram incubadas na mesma concentração com anticorpo irrelevante para o controle de isotipo (IgG). Após incubação com o anticorpo primário e todas as lavagens dos cortes foram realizadas com TBS contendo 1% de soro de cabra. A reação foi visualizada por meio do kit polivalente Dako-advance HRP Link (cat. # K4069, Dako, EUA) de acordo com a recomendação do fabricante. A reação foi revelada por precipitação de 3,3'-diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit, 3,3'-diaminobenzidine, cat. # SK-4100). Para finalizar os cortes foram contra-corados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e as lâminas montadas para análise sob microscopia de luz.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Para melhor compreensão, os resultados foram divididos em análise histológica e de imunohistoquímica.

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS COELHOS SUBMETIDOS A HEMISSECÇÃO MEDULAR

Na análise da coloração de Hematoxilina e Eosina, nos cortes da medula dos animais do grupo controle, podemos observar que não houve alteração tecidual (Figura 4, A, B e C). Já no grupo G2 e G3, podemos observar vacuolização neuronal, ausência de neurônios corados e intensa degeneração neuronal. Outros achados relevantes foram: edema, necrose, infiltrado celular e cavitação. A região da lesão aparentou extensa desorganização demonstrada na figura 4, D, E, F, G, e I, com região mais alterada evidenciada pelas setas.

Figura 4 - Corte transversal da medula dos animais controle e tratados com células-tronco

Fonte – Bocabello, R. Z. (2013).

Legenda: Em A, B e C fotomicrografias de animal controle, demonstrando um tecido sem alteração (aumento de 4x, 10x e 20x respectivamente). D, E e F fotomicrografias de animais que receberam células-tronco, observa-se vacuolização neuronal, ausência de neurônios corados e intensa degeneração neuronal. G, H e I fotomicrografias de animais que receberam células-tronco e injeção de condroitinase, observa-se os mesmos achados citados das imagens D, E e F. Coloração: Hematoxilina e eosina

Foram realizados cortes longitudinais nos animais controles, a fim de identificar a lesão como um todo. A área lesionada foi delimitada em preto na figura 5. Foi notado a presença de rarefação celular, além de desorganização e extensas áreas de vacuolização neuronal.

Figura 5 – Fotomicrografias da medula de coelho submetido à hemisseção dorsal

Fonte – Bocabello, R. Z. (2013).

Legenda: Em A - Observa-se rarefação celular da medula na região dorsal. Em B – Infiltrado celular evidenciado pelo triângulo. Coloração: Hematoxilina e eosina

Na análise de Picrossírius, observamos que não houve alteração nos animais controles e nos animais que somente receberam células-tronco (Figura 6, A e C). Entretanto nos animais que receberam células-tronco e injeção de condroitinase, observamos a polarização da cor vermelha através da birrefringência do tecido, evidenciando a presença de fibras colágenas do tipo I (Figura 6, B).

Figura 6 - Corte histológico da medula espinhal de coelhos submetidos a hemissecção dorsal

Fonte – Bocabello, R. Z. (2013).

Legenda: Em A – Animal controle sem evidência de colágeno. Em B - Animal tratado com células-tronco de epitélio olfatório de coelho mais condroitinase ABC apresentando evidência de formação de colágeno do tipo I. Em C – Animal que recebeu somente células-tronco do epitélio olfatório de coelho sem evidência da formação de colágeno do tipo I. Coloração: Picrosírius

5.2 Análise de imunohistoquímica

Foi observado marcação positiva na análise da expressão do anticorpo anti-sulfato de condroitina em sua porção lesionada (Figura 7).

Figura 7 – Fotomicrografias da expressão do anticorpo anti-sulfato de condroitina na lesão medular espinhal por hemisseção dorsal em coelhos

Fonte – Bocabello, R. Z. (2013).

Legenda: Em A – Controle negativo sem anticorpo primário. B- Expressão de sulfato de condroitina proteoglicano na lesão medular espinhal de coelhos causada por hemisseção dorsal, sendo evidenciada no círculo

Foi observado a expressão positiva no tecido lesionado do anticorpo anti-proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein - GFP*), comprovando a presença das células do epitélio olfatório injetadas no foco da lesão medular (Figura 8).

Figura 8 – Expressão do anticorpo anti-GFP em região de medula espinhal de coelhos submetidos a hemisseccção medular dorsal da medula espinhal

Fonte – Bocabello, R. Z. (2013).

Legenda: Em A – Animais que receberam somente células-tronco observa-se marcação positiva demonstrando a expressão do anticorpo anti GFP. B – Animais que receberam células e injeção de condroitinase, observa-se também marcação positiva para a expressão do anticorpo anti GFP. C – Controle negativo dos animais que receberam células-tronco e D – controle negativo dos animais que receberam células-tronco e injeção de condroitinase

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Diante a existência de trabalhos na literatura acerca da hemissecção dorsal (HD) em ratos (XU et al., 1995; 1999) e dos trabalhos relevantes quanto a produção de modelos animais de lesão medular em coelhos propostos por Lyalka et al. (2009) procedeu-se um estudo elegendo a hemissecção dorsal como procedimento mais adequado para realizar nos coelhos.

Embora as técnicas cirúrgicas sejam baseadas apenas na avaliação clínica, os resultados da técnica aplicada neste estudo corrobora com os dados obtidos por Lyalka et al. (2009). Os autores ainda demonstraram que a técnica de hemissecção ventral produz um déficit locomotor em coelhos, não havendo recuperação do quadro clínico mesmo após 42 dias de avaliação. Já em nosso estudo, mesmo após 30 dias da realização da técnica cirúrgica de hemissecção medular dorsal, os animais não retornaram a sua função normal, nem mesmo apresentaram melhora funcional.

Em relação a coleta de tecido do sistema nervoso central para avaliação histológica ou imunohistoquímica, alguns cuidados devem ser redobrados. Blits et al. (2005) realizaram perfusão transcardíaca de solução salina gelada após anestesia, seguida de perfusão de paraformaldeído a 4% por via transcardíaca, imediatamente coletaram o material da medula espinhal e incluíram em paraformaldeído a 4% em temperatura de geladeira por mais 24 horas. Após passaram este material para a sucrose a 30% até o dia de processamento. O mesmo protocolo é descrito por Ikegami et al. (2005). Diante estas descrições, optamos por realizar o mesmo protocolo de coleta para o material histológico.

Neste experimento após a eutanásia dos animais, rastreamos a cicatriz da glia através da marcação com o anticorpo anti-sulfato de condroitina proteoglicano, mesmo em porções anteriores a lesão causada.

Hu et al. (2010) em um estudo observou que a formação da cicatriz da glia ocorreu após quatro semanas pós a lesão medular causada por aparelho de impacto com peso constante. Os autores detectaram a lesão através da detecção dos astrócitos reativos com o anticorpo anti-GFAP (*glial fibrillary acid protein*). Nesse estudo os autores avaliaram a presença dos astrócitos reativos na lesão medular, e constataram que houve a formação da cicatriz da glia após 4 semanas da lesão medular. Entretanto não podemos afirmar que o mesmo acontece em coelhos.

Rolls et al. (2008) relatou que a cicatriz da glia é a principal dificuldade para a regeneração da lesão medular. Observamos que muitos estudos envolvendo a terapia celular na lesão medular necessitam de maiores informações a cerca da interação da mesma com os agentes terapêuticos utilizados no seu tratamento. Sendo assim o estudo do comportamento das células-tronco diante à barreira da cicatriz glial é de grande importância para entender os acontecimentos inerentes a uma terapia no sistema nervoso central.

Através da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein – GFP*), Yano et al. (2005) detectaram células da medula óssea contendo a proteína verde fluorescente. Os autores rastrearam suas células em três dos seis animais utilizados após e 4 semanas do transplante. Em nosso estudo conseguimos rastrear células no foco da lesão medular, indicando que ou as células não conseguiram ultrapassar a cicatriz glial, ou o tempo foi muito curto para que pudessem emitir feixes posteriores a lesão medular.

Blits et al. (2005) durante um estudo de transplante de células progenitoras neurais contendo a proteína verde fluorescente na lesão medular de ratos, conseguiram rastrear as mesmas após 12 semanas do transplante, comprovando assim, a capacidade duradoura de expressão gênica da proteína verde fluorescente *in vivo*. Em nosso estudo, rastreamos as células-tronco do epitélio olfatório de coelhos, transduzidas com *GFP* quatro semanas após o transplante celular e conseguimos observar a sobrevivência das mesmas após transplante.

Apesar de poucos trabalhos utilizarem a via local (intra-medular) em ensaios clínicos em humanos para transplante das células-tronco, Mackay-Sim et al. (2008) produziu um trabalho muito relevante. Neste experimento, optamos pela via local para a terapia celular da lesão medular em coelhos, pois levamos em consideração que as perdas celulares seriam menores quando comparadas a outras vias, tais como a via epidural, ou a via intravenosa, adicionando que o próprio nicho celular deva fornecer nutrientes e subsídios para a diferenciação das células injetadas em células de origem nervosa.

Esta observação foi confirmada em trabalhos posteriores realizados por Paul et al. (2009) em um estudo com ratos. Estes foram divididos em três grupos de 6 animais cada e as vias escolhidas foram a via intravenosa, punção lombar e via local. Tais autores comprovaram a eficiência da via epidural quando comparada a via intravenosa, e a via local como a mais efetiva para o fornecimento de células no tecido lesionado.

Trabalhos mais atuais apostam na resolução da cicatriz da glia associadas às terapias com células-tronco para o tratamento da lesão medular crônica (IKEGAMI et al., 2005; SIEBERT et al., 2011). A imunização com vacina recombinante que atua

no sítio de ligação dos inibidores de crescimento axonal (Nogo A, AMG e OMP) nas células axonais (YU et al., 2008) e mesmo o tratamento com anticorpos anti-Nogo A (FREUND et al., 2009) parecem o futuro das terapias na lesão medular. O conjunto dessas terapias associada à terapia com as células-tronco podem representar uma esperança bastante realista na busca da cura das lesões medulares.

7 CONCLUSÃO

A hemisseccção medular dorsal em coelho é uma técnica de fácil execução que leva a paralisia dos membros pélvicos fornecendo um modelo animal válido para a pesquisa científica.

A técnica de injeção da condroitinase ABC e das células-tronco de epitélio olfatório de coelho através de injeção guiada por US é factível e inócua ao animal.

As células-tronco de epitélio olfatório de coelho transduzidas com o gene repórter GFP foram eficientemente, comprovando o sucesso do transplante celular, e a adesão das células no foco da lesão criada.

A expressão do GFP foi mais evidente nos animais tratados apenas com células-tronco de epitélio olfatório de coelho quando comparados ao grupo tratado com células tronco de epitélio olfatório de coelho e condroitinase ABC.

A identificação da formação do colágeno tipo 1 pela técnica do picrossírius em animais tratados com a enzima condroitinase ABC e implante de célula-tronco de epitélio olfatório de coelho, mostrou que a enzima pode atrapalhar na regeneração medular no período em que foi utilizada ou pela concentração, via de aplicação e talvez pela repetição das microinjeções. Abrindo dessa forma uma linha de pesquisa sobre a otimização do uso desta enzima no tempo e formação da cicatrização glial.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AZIZI, S. A.; STOKES, D.; PROCKOP, D. J. Survival, migration and engraftment of bone marrow stromal cells into the striatum of the adult rats. **Experimental Neurology**, v. 153, n. 2, p. 374-375, 1998.
- BAPTISTE, D. C.; FEHLINGS, M. G. Update on the treatment of spinal cord injury. **Neurotrauma: new insights into pathology and treatment**, v. 161, p. 217-33, 2007.
- BRAY, J. P.; BURBIDGE, H. M. The canine intervertebral disk: part one: structure and function. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 34, p. 55-63, 1998.
- CAO, F. J.; FENG, S. Q. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. **Chinese Medical Journal**, v. 122, p. 225-231, 2009.
- CARONI, P.; SCHWAB, M. E. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of cns white matter. **Neuron**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 1988.
- COLE, T. C.; BURKHARTD, D.; FROST, L.; GHOSH, P. The proteoglycans of the canine intervertebral disk. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 839, p. 127-138, 1985.
- COSTA, R. C. Disco intervertebral: base para o diagnóstico e tratamento da doença. **Revista Nosso Clínico**, São Paulo, v. 20, p. 18-26, 2001.
- FERNÁNDEZ, V. L.; BERNARDINI, M. **Neurologia em cães e gatos**. São Paulo: Editora MedVet, 2010. 447 p.
- FOURNIER, A. E.; GRANDPRE, T.; STRITTMATTER, S. M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 341-346, 2001.
- FREUND, P.; SCHMIDLIN, E.; WANNIER, T.; BLOCH, J.; MIR, A.; SCHWAB, M.E.; ROUILLER, E.M. Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates--re-examination and extension of behavioral data. **European Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 5, p. 983-96, 2009.
- GRANDPRE, T.; STRITTMATTER, S. M. Nogo: A molecular determinant of axonal growth and regeneration. **Neuroscientist**, v. 7, n. 5, p. 377-386, 2001.
- HU, R.; ZHOU, J.; LUO, C.; LIN, J.; WANG, X.; LI, X.; BIAN, X.; LI, Y.; WAN, Q.; YU, Y.; FENG, H. Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. **Journal of Neurosurgery Spine**, v. 13, n. 2, p. 169-80, 2010.

IKEGAMI, T.; NAKAMURA, M.; YAMANE, J.; KATOH, H.; OKADA, S.; IWANAMI, A.; WATANABE, K.; ISHII, K.; KATO, F.; FUJITA, H.; TAKAHASHI, T.; OKANO, H.J.; TOYAMA, Y.; OKANO, H. Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-positive fibers after rat spinal cord injury. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 3036-46, 2005.

IWANAMI, A.; KANEKO, S.; NAKAMURA, M.; KANEMURA, Y.; MORI, H.; KOBAYASHI, S.; YAMASAKI, M.; MOMOSHIMA, S.; ISHII, H.; ANDO, K.; TANIOKA, Y.; TAMAOKI, N.; NOMURA, T.; TOYAMA, Y.; OKANO, H. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. **Journal of Neuroscience Research**, v. 80, n. 2, p. 182-190, 2005.

JOHANSSON, C. B.; MOMMA, S.; CLARKE, D. L.; RISLING, M.; LENDAHL, U.; FRISEN, J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. **Cell**, v. 96, n. 1, p. 25-34, 1999.

JONES, L. L.; MARGOLIS, R. U.; TUSZYNSKI, M. H. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 182, n. 2, p. 399-411, 2003.

JONHSON, E. F.; CALDEW, R. W.; BERRYMAN, H. E.; MILLER, A.; CHETTY, K. Elastic fibers in the anulus fibrosus of the dog intervertebral disk. **Acta Anatomica** (Basel), v. 118, p. 238-242, 1984.

KNECHT, C. D. Results of surgical treatment for thoracolumbar disc protrusion. **The Journal of Small Animal Practice**, v.13, n. 8, p. 449-53, 1972.

KRASSIOUKOV, A.; CLAYDON, V. E. The clinical problems in cardiovascular control following spinal cord injury: an overview. **Autonomic dysfunction after spinal cord injury**, v. 152 , p. 223-229, 2006.

LECOUTEUR, R. A.; CHILD, G. Moléstias da medula espinhal. In ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1992. p. 655-736.

LEE, K. H.; SUH-KIM, H.; CHOI, J. S.; JEUN, S. S.; KIM, E. J.; KIM, S. S.; YOON, D. H.; LEE, B. H. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 67, n. 1, p. 13-22, 2007.

LIM, J. H.; BYEON, Y. E.; RYU, H. H.; JEONG, Y. H.; LEE, Y. W.; KIM, W. H.; KANG, K. S.; KWEON, O. K. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 3, p. 275-282, 2007.

LIMA, C.; PRATAS-VITAL, J.; ESCADA, P.; HASSE-FERREIRA, A.; CAPUCHO, C.; PEDUZZI, J. D. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: A pilot clinical study. **Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 29, n. 3, p. 191-203, 2006.

LYALKA, V. F.; ORLOVSKY, G. N.; DELIAGINA, T. G. Impairment of Postural Control in Rabbits with Extensive Spinal Lesions. **Journal of Neurophysiology**, v. 101, n.4, p. 1932–1940, 2009.

MACKAY-SIM, A.; FERON, F.; COCHRANE, J.; BASSINGTHWAIGHTE, L.; BAYLISS, C.; DAVIES, W.; FRONEK, P.; GRAY, C.; KERR, G.; LICINA, P.; NOWITZKE, A.; PERRY, C.; SILBURN, P. A. S.; URQUHART, S.; GERAGHTY, T. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. **Brain**, v. 131, p. 2376-2386, 2008.

MARSHALL, G. P.; LAYWELL, E. D.; ZHENG, T.; STEINDLER, D. A.; SCOTT, E. W. In vitro-derived "neural stem cells" function as neural progenitors without the capacity for self-renewal. **Stem Cells**, v. 24, n. 3, p. 731-738, 2006.

MCKERRACHER, L.; DAVID, S.; JACKSON, D. L.; KOTTIS, V.; DUNN, R. J.; BRAUN, P. E. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. **Neuron**, v. 13, n. 4, p. 805-811, 1994.

NESATHURAI, S. Steroids and spinal cord injury: Revisiting the NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. **Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care**, v. 45, n. 6, p. 1088-1093, 1998.

NOSRAT, I. V.; WIDENFALK, J.; OLSON, L.; NOSRAT, C. A. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. **Developmental Biology**, v. 239, n. 1, p. 176-176, 2001.

OGAWA, Y.; SAWAMOTO, K.; MIYATA, T.; MIYAO, S.; WATANABE, M.; NAKAMURA, M.; BREGMAN, B. S.; KOIKE, M.; UCHIYAMA, Y.; TOYAMA, Y.; OKANO, H. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 69, n. 6, p. 925-933, 2002.

OLSON, L. Medicine: Clearing a path for nerve growth. **Nature**, v. 416, n. 6881, p. 589-590, 2002.

PAUL, C.; SAMDANI, A. F.; BETZ, R. R.; FISCHER, I.; NEUHUBER, B. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. **Spine**, v. 15, n. 34, 328-334, 2009.

RAMON Y CAJAL, S. **Degeneration and regeneration of the nervous system**. New York: Oxford University Press, 1928.

RASOULI, A.; BHATIA, N.; DINH, P.; CAHILL, K.; SURYADEVARA, S.; GUPTA, R. Resection of glial scar following spinal cord Injury. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 7, p. 931-936, 2009.

ROLLS, A.; SHECHTER, R.; LONDON, A.; SEGEV, Y.; JACOB-HIRSCH, J.; AMARIGLIO, N.; RECHAVI, G.; SCHWARTZ, M. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: A role in microglia/macrophage activation. **Plos Medicine**, v. 5, n. 8, p. 1262-1277, 2008.

ROLLS, A.; SHECHTER, R.; SCHWARTZ, M. Neuron glia interactions - opinion the bright side of the glial scar in CNS repair. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 235-291, 2009.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, p.13-19, 2005.

SEIM, H. B. Conditions of the thoracolumbar spine. **Seminars in Veterinary Medicine Surgery (Small Animals)**, v. 4, p. 235-53, 1996.

SIEBERT, J. R.; STELZNER, D. J.; OSTERHOUT, D. J.; Chondroitinase treatment following spinal contusion injury increases migration of oligodendrocyte progenitor cells. **Experimental Neurology**, v. 231, n. 1, p. 19-29, 2011.

SHARP, N. J. H.; WHEELER, S. J. **Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery**. 2. ed. St. Louis: Mosby Wolf, 2005.

SHIELDS, L. B. E.; ZHANG, Y. P.; BURKE, D. A.; GRAY, R.; SHIELDS, C. B. Benefit of chondroitinase ABC on sensory axon regeneration in a laceration model of spinal cord injury in the rat. **Surgical Neurology**, v. 69, n. 6, p. 568-577, 2008.

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

TOM, V. J.; HOULE, J. D. Intraspinal microinjection of chondroitinase ABC following injury promotes axonal regeneration out of a peripheral nerve graft bridge. **Experimental Neurology**, v. 211, n. 1, p. 315-319, 2008.

TOOMBS, J. P.; BAUER, M. S. Afecção do Disco Intervertebral, em SLATTER, et al. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. Ed. São Paulo: Ed. Manole.1995.

XU, X. M.; GUENARD, V.; KLEITMAN, N.; AEBISCHER, P.; BUNGE, M. B. A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. **Experimental Neurology**, v. 134, p. 261–272, 1995.

XU, X. M., ZHANG, S. X., LI, H., AEBISCHER, P.; BUNGE, M. B. Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell–seeded mini-channel implanted into hemisected adult rat spinal cord. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 1723–1740, 1999.

YANO, S.; KURODA, S.; LEE J. B.; SHICHINOHE, H.; SEKI, T.; IKEDA, J.; NISHIMURA, G.; HIDA, K.; TAMURA, M.; IWASAKI Y. In vivo fluorescence tracking of bone marrow stromal cells transplanted into a pneumatic injury model of rat spinal cord. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, n. 8, p. 907-918, 2005.

YU, P. P.; HUANG, L. D.; ZOU, J.; YU, Z. H.; WANG, Y. X.; WANG, X. F.; XU, L.; LIU, X. Q.; XU, X. M.; LU, P. H. Immunization with recombinant Nogo-66 receptor (NgR) promotes axonal regeneration and recovery of function after spinal cord injury in rats. **Neurobiology of Disease**, v. 32, n. 3, p. 535-542, 2008.