CARLOS ALBERTO PALMEIRA SARMENTO

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA DE FETOS CANINOS
EM CÃES ADULTOS COM LESÃO MEDULAR CRÔNICA TORACOLOMBAR**

São Paulo

2012

CARLOS ALBERTO PALMEIRA SARMENTO

Utilização de células tronco da medula óssea de fetos caninos em cães adultos com lesão medular crônica toracolombar

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angelica Miglino

São Paulo

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2713
FMVZ

Sarmiento, Carlos Alberto Palmeira

Utilização de células tronco da medula óssea de fetos caninos em cães adultos com lesão medular crônica toracolombar / Carlos Alberto Palmeira Sarmiento. -- 2012.
83 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Cão. 2. Medula-espinhal. 3. Célula-tronco. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Utilização de células tronco da medula óssea de fetos caninos em cães adultos com lesão medular crônica toracolombar”, protocolado sob o nº 2063/2010, utilizando 8 (oito) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, 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 24/11/2010.

We certify that the Research “The use of fetus bone marrow stem cells in adult dogs with chronic spinal cord compression”, protocol number 2063/2010, utilizing 8 (eight) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, 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 11/24/2010.

São Paulo, 11 de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SARMENTO, Carlos Alberto Palmeira

Título: Utilização de células tronco da medula óssea de fetos caninos em cães adultos com lesão medular crônica toracolombar

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Enfim chega o tão esperado momento, o momento de agradecer por tudo que aconteceu comigo durante esses anos de doutorado, é hora de tentar retribuir com palavras toda a ajuda que recebi de tantas pessoas e uma coisa é certa, sem a ajuda de vocês eu definitivamente não conseguiria.

Meu DEUS, muito obrigado por colocar tantas pessoas especiais no meu caminho, com certeza elas foram entrando em minha vida guiadas por sua vontade.

Gostaria de agradecer ao meu amado pai, amigo, irmão, ídolo, exemplo e referência Carlos Sarmento por simplesmente ser o homem no qual eu me espelho pra ser uma pessoa melhor, o senhor com esse jeito de poucas palavras, me inspira com suas ações. Pai muito obrigado por tudo, por compreender a minha ausência todos esses anos, por não medir esforços para sempre me dar todas as condições para viver de uma maneira confortável em São Paulo, por sempre que foi possível me mandar para casa pra matar um pouco da saudade de vocês. Te amo

Agradecer a minha amada mãe Salvia Maria por ser a mãe que sempre me acalmou, que sempre orou por mim e que suportou tanto a saudade sempre me dizendo que estava tudo bem e que eu não me preocupasse, por sempre deixar o meu quarto arrumado e fazer a maior questão que eu dormisse ao lado dela, só para poder fazer carinho em meus cabelos. Mãe, com certeza as orações da senhora me deram força que eu nem imaginava que tinha nos momentos difíceis que passei aqui. Seu filho esta voltando para o seu colo, te amo mãe.

As irmãs mais especiais do mundo inteiro, Polyana com seu jeito calmo, meigo e otimista, sempre me colocando pra frente e me incentivando de todas as formas a nunca fraquejar, as visitas que ela me fez em São Paulo, só eu sei como me confortaram e me fizeram bem, as comidinhas deliciosas que ela sempre fez questão de fazer por aqui, sempre me lembrando como sou amado e protegido. Irmã, muito obrigado por dividir o posto de melhor irmã do mundo com Salvyana.

A minha irmã Salvyana com quem sempre dividi tantos sonhos e objetivos, com sua vida tão corrida sempre achava um jeito de falar comigo, me incentivar e me acalmar nas horas que eu mais precisava, por sempre estar disponível para escutar

as minhas lamentações e dizer “fique calmo irmão, tudo vai dar certo”, por sempre me receber em sua casa da melhor maneira possível. Como se não bastasse tudo isso, me deu dois tesouros de valor inestimável: Ana Letícia e Ana Beatriz que pelo simples fato de existirem abrilhantaram mais a vida de toda a família, seus sorrisos me encantam, me confortam e me inspiram. Seu tio ama vocês e não vê a hora de estar de volta, para poder fazer o que não pude durante estes anos longe. A minha afilhada Luana, dindinho seu simples sorriso me serve de inspiração para sempre seguir em frente, te amo.

Gostaria de agradecer muito e com certeza vão me faltar palavras, a minha melhor amiga, minha namorada, minha eterna amante e meu amor Dilayla. Meu anjo, muito obrigado pela convivência, pelas palavras, pelos gestos, pelo carinho, pelo amor e pela ajuda determinante para a conclusão desse trabalho, seja com o processamento das células, filmagem dos cães, lida no trabalho, convecção de tabelas e outras tantas coisas. Quantas coisas fizemos juntos e quantas ainda faremos não é. Com você eu pude aprender como ser um homem mais responsável e melhor em todos os sentidos, sem você na minha vida com certeza essa tese não teria o mesmo brilho. Ter você na minha vida ainda me trouxe seus pais, pessoas maravilhosas que mesmo comigo longe de casa, me fizeram sentir em casa todas as vezes que estive com vocês, por serem pais carinhosos comigo também e por torcerem por mim sempre me incentivando. Muito obrigado meus sogros.

Gostaria de agradecer aos meus tios e primos, em especial a minha madrinha Silvia, minha tia querida que nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Ao meu tio José Arnaldo, um dos maiores responsáveis por mais essas vitórias, afinal, foi ele que me mandou pra cá e através das histórias que ouço falar dele, procuro sempre trilhar meus caminhos seguindo seus passos. Meu tio Expedito, pessoa simples que me tem como um filho e sempre procurou me ajudar da sua maneira. Ao meus primos Marcos Palmeira pela convivência em São Paulo e por ter se tornado um verdadeiro irmão, ao meu primo Augusto Cesar, por ter feitos as vezes de filho não medindo esforços para ajudar minha mãe sempre que foi preciso. Ao primo Eduardo Laércio pelas sempre divertidas visitas, e aos demais primos por torcerem por mim nessa caminhada.

Gostaria de agradecer a uma pessoa muito especial nessa caminhada e que me acompanha desde o meu primeiro dia em São Paulo, minha orientadora e grande amiga Maria Angelica Miglino. Professora, sua garra em sempre querer crescer, sua gana em buscar sempre mais e se superar a cada momento, isso é fonte de

inspiração para cada um dos seus alunos. Meu muito obrigado por me mostrar o pico da montanha sem me levar até lá, escalar essa montanha não foi nada fácil, mas com seus conselhos, broncas, exemplo e convivência diária essa escalada se mostrou possível e prazerosa. Essa vitória se deve muito aos ensinamentos que a senhora me passou durante todo esse tempo em São Paulo. Muito obrigado por toda a consideração e carinho para com toda a minha família e por sempre deixar as portas da sua casa aberta para me receber

Quando vim para São Paulo, me pegava pensando se faria amigos por aqui e hoje tenho a certeza que não fiz apenas amigos, fiz irmão que vou levar para a vida inteira.

Aos irmãos da melhor república do mundo e irmão agregados: Evander, Thiago, Valdir, Rodrigo, Caio, Marcão e Guilherme. Conviver com você por todo esse período foi uma das melhores coisas que me aconteceu em São Paulo, vocês são especiais demais na minha vida, cada almoço, churrasquinho, Vodkinha (vixeeeeeeeeeee) me fizeram esquecer a saudade de casa e fazer laços que jamais serão esquecidos, tenho certeza que levarei a amizade de vocês para a vida inteira e espero vê-los o quanto antes em Aracaju. Amo vocês.

Aos grandes amigos desde a época do pensionato : Vinícius e Rodolfo, a amizade de vocês é algo pra vida toda e jamais será esquecida.

Aos amigos da “sala da chefe” e agregados: André, Rafael, Marcio, Fernanda, Greyson, Amanda, Bruno, Phelipinho, Marinha, Erika, Catarina, Ana, Rosângela, Horácio, Paulinha, Thais, Leticia, Nathia, por compartilharem tantos momentos difíceis e tantas alegrias, conviver com cada um de vocês me tornou uma pessoa melhor. Meu muito obrigado.

Ao casal Luiz e Renatinha pela amizade e por colocar a princesinha Larissa na vida da gente.

Aos “assissetes”: Bruno, Vitoria, Francielusa, Paulo, Amilton, Maria Angélica e Diego

Aos amigos que passaram por aqui e deixaram muita saudade: Drika, João, Patrícia, Marina, Elaine (cara amiga), Carol

Aos amigos de Aracaju que compartilharam comigo a saudade de casa: Geraldinho, Marcel, Raul, José Siqueira (Zezinho), Tadeu e Julinho.

Aos amigos da família Villa D'ouro que sempre estiveram torcendo por mim.

A todos os amigos de Aracaju, os quais seria impossível citar os nomes, mas que sempre me incentivaram e torceram muito por mim nessa caminhada.

Aos professores : Durvanei, por toda a amizade e sugestões na qualificação, Dra. Irvênia, por me receber em sua casa e com toda a sua experiência, tornar simples o que antes parecia tão complicado e Marcelo pela grande ajuda na reta final

Aos professores :Carlos Eduardo, Assis, Alan Peres, José Roberto e Marcelo, Vicente Borelli e em especial Pedro Bombonato, que com seu dom da palavra, me deixou ensinamentos que jamais esquecerei

Ao meu amor Dilayla e a Sonia, Dayane, Paula Fratine, Isabela, Fabiele, Graciella e professora Patricia Braga pela ajuda com o processamento e obtenção das células-tronco.

A Dra. Cristiane por ter cedido parte das células e por ser sempre essa grande amiga.

Ao grande companheiro nessa jornada, Dr. Matheus, presente em grande parte desse trabalho, dividindo comigo as angustias e tristezas e também celebrando comigo as alegrias e vitórias não muito obrigado por tudo.

Agradecimento especial ao amigo Anderson e toda a sua família, que me acolheram no início dessa jornada me fazendo parte dessa família maravilhosa. São 20 anos de uma amizade que tenho certeza que será para sempre.

Gostaria de agradecer ao Hospital Veterinário Cães e Gatos, na pessoa do Dr. Francisco Hato por ter aberto as portas para a realização do trabalho, me dando toda a infraestrutura possível para fazer os exames dos meus animais e colocando profissionais extremamente qualificados para a realização destes exames. Meu muito obrigado a toda sua equipe. Um agradecimento especial ao Dr. Clemente, Dr. Célio, Dra. Raquel, Dra.Maristela, Dr. Gustavo.

Aos amigos Dr. Renato pela parceria e por abrir as portas da sua clínica para a realização de boa parte desse trabalho, Dra Juliana, sempre disposta a anestesiá-los nossos animais com profissionalismo e Dr. Robson por toda a ajuda com os laudos, por sempre estar disposto a ajudar na seleção das imagens e por se tornar colaborador desse trabalho.

Agradeço imensamente ao Dr. Adriano pelas indicações de vários pacientes, demonstrando que acreditava na nossa ideia e a Dra. Stella que além de indicar

outros tantos pacientes, nos ajudou imensamente com a realização das fisioterapias, filmagens e avaliações pós-cirúrgicas.

Agradeço a equipe de fisioterapia do Hospital Cães e Gatos, Dra. Patrícia e Dra. Gabriela por toda a ajuda na realização desse trabalho.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que tive a oportunidade de conhecer na Universidade da Carolina do Norte, em especial Dra. Natasha Olby e Dr. Ji-hey pelos ensinamentos e pelas sugestões que com certeza acrescentaram muito para este trabalho.

Aos amigos funcionários da anatomia: Maicon, Jackeline, Ednaldo, Diogo, Ronaldo, Rose e Augusto por serem sempre tão solícitos, ajudando a todos nos sempre com boa vontade. Muito obrigado pelo carinho.

A Rose secretária que mesmo com tantas atribuições, nunca negou ajuda em momento nenhum dessa caminhada. Muito obrigado por tudo.

A todos os funcionários da FMVZ-USP em especial as meninas da biblioteca e da cantina, por sempre nos receberem com o sorriso estampado no rosto e por serem tão prestativas.

Gostaria de agradecer imensamente aos proprietários dos meus pacientes, por terem acreditado no nosso trabalho e deixado seus “filhos” peludos sobre a nossa responsabilidade durante esse período, e a todos os nossos pacientes: Bola, Frederico, Bond, Jonnhie Walker, Nisshin, Sadan, Jonnhie, Maisha e Vitória que mesmo sem ter consciência dos seus atos, contribuíram muito para a realização de um trabalho que com certeza no futuro irá ajudar ainda mais animais. Sem vocês, nada desse trabalho poderia ter sido feito.

Aos meus filhos Brutos e Filomena, só eu sei o quanto vocês apenas com seus latidos e lambidas carinhosos, me deram força durante essa caminhada. Papai vai morrer de saudade de vocês.

Em um momento de tamanha emoção, seria impossível lembrar de todas as pessoas que me ajudaram nesta longa caminhada, mas com certeza eu fiz questão de agradecer no momento em que me ajudaram e volto a agradecer novamente. Muito obrigado a todos que contribuíram para essa vitória.

DEDICATÓRIAS

Gostaria de dedicar essa tese de doutorado a toda a minha família, mas em especial a uma pessoa simples, com o maior coração que eu conheci e que com certeza me deu a mão lá do céu nos momentos difíceis. Meu avô Sebastião Palmeira. Vô o senhor não sabe como é especial, como deixou saudades e como seu exemplo continua bem vivo dentro de mim.

Te amo. Saudades eternas.

RESUMO

SARMENTO, C. A. P. **Utilização de células tronco da medula óssea de fetos caninos em cães adultos com lesão medular crônica toracolombar.** [The use of fetus bone marrow stem cells in adult dogs with chronic spinal cord compression]. 2012. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

As lesões medulares acometem anualmente milhares de pessoas e animais em todo o mundo, causando diversos prejuízos econômicos e psicológicos. As principais causas das lesões medulares são traumas automobilísticos e doenças do disco intervertebral. Muito embora a medicina esteja bastante avançada no campo da neurocirurgia, a cura para esse tipo de lesão ainda esta longe de ser obtida. O avanço das pesquisas no campo da terapia celular em lesões medulares surge como uma esperança para os pacientes crônicos. Neste trabalho buscamos avaliar a reposta do tratamento com células-tronco de medula óssea fetal canina em cães com lesão medular crônica toracolombar. Nosso trabalho se baseia em parâmetros clínicos, comportamentais, de imagem e fisioterápicos. Antes de adentrar no experimento, todos os cães foram submetidos a vários exames pré-operatórios (hemograma, exames bioquímicos, eletrocardiograma) para então serem encaminhados para o exame de ressonância nuclear magnética visando um diagnostico mais preciso da lesão. Após esse exame, os cães foram avaliados por fisioterapeutas veterinários que não pertenciam ao nosso grupo de pesquisa para se estabelecer uma pontuação no teste comportamental de Olby. Os animais também tiveram alguns outros reflexos testados (dor profunda, reflexo de pânículo). Após a primeira avaliação, os animais foram submetidos à procedimento cirúrgico de descompressão da medula espinhal e aplicação de células-tronco da medula óssea fetal canina. Durante o procedimento foram injetados 1×10^6 células diretamente em 3 pontos distintos da medula espinhal. Após o procedimento os cães foram encaminhados para a fisioterapia, e por 3 meses, foram submetidos a diversos exercícios de reabilitação com o intuito de potencializar um possível efeito benéfico da terapia celular. Durante a fisioterapia, os animais foram filmados com o intuito de acompanhar a sua evolução, e após o termino da fisioterapia foram novamente avaliados pelos fisioterapeutas. Ao final do experimento 7 animais foram operados e os resultados obtidos demonstraram um aumento do reflexo de marcha em 6 deles. O único animal que não apresentou essa melhora da marcha foi aquele acometido por outra patologia associada à

compressão medular. Esses resultados nos levam a sugerir uma ação benéfica da terapia celular em cães portadores de lesão medular crônica. Por outro lado sugere continuar recrutando animais com o objetivo de aprimorar as técnicas utilizadas, para conseguir resultados cada vez melhores.

Palavras-chave: Cão. Medula-espinhal. Célula-tronco.

ABSTRACT

SARMENTO, C. A. P. **The use of fetus bone marrow stem cells in adult dogs with chronic spinal cord compression.** [Utilização de células tronco da medula óssea de fetos caninos em cães adultos com lesão medular crônica toracolombar]. 2012. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Spinal cord injuries annually involve thousands of people and animals worldwide, causing economic and psychological damages. The main causes of spinal cord injuries are vehicular traumas and intervertebral disc diseases. Although medicine is very advanced in neurosurgery field, the cure for this type of injury is still far from being achieved. Research progresses in cell therapy for spinal cord injuries appear to be a hope for chronic patients. In this article we aimed to evaluate clinical responses to the treatment using canine fetal bone marrow stem cells in dogs with thoracolumbar chronic spinal cord injury. Our study was based on the evaluation of clinical signs, animal behavior, imaging and physiotherapy aspects. Before clinical-surgery trial, all dogs underwent to preoperative tests as hemogram, blood chemistry, electrocardiogram and to nuclear magnetic resonance exam, in order to establish more accurate diagnosis of the injury. Following clinical exams, Olby score was determined by evaluating animal behavior. Olby tests were performed by external scientific research group, composed by veterinary physiotherapists, in order to guarantee blind evaluation. Animals were also tested to deep pain and panniculus reflexes. After being evaluated, animals underwent surgical spinal cord decompression and to a 1×10^6 stem cells injection in three different sites of the spinal cord. After the procedure, dogs were referred to physiotherapy for three months, undergoing to a variety of rehabilitation exercises in order to improve cell therapy hypothetical benefic effect. During therapy, animals were filmed in order to monitor their evolution, and after the end of physiotherapy they were re-evaluated by physiotherapists. At the end of the experiment, 7 animals were operated and had resulted in an increase of reflex motion in 6 of them. The only animal that showed no such improvement was the one who's had other pathology associated with the spinal cord compression, these results lead us to believe in a beneficial action of cell therapy in dogs with chronic spinal cord injury and suggests continue recruiting animals with the aim of improving the techniques used to achieve better results

Keywords: Dog. Spinal cord. Stem cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografias demonstrando o processo utilizado para obtenção da medula óssea fetal	31
Figura 2	Fotomicrografia das células flutuantes que foram desprezadas (A) e células-tronco indiferenciadas (B)	32
Figura 3	Animal devidamente sedado e preparado durante a realização do exame de ressonância nuclear magnética	34
Figura 4	Fotografias referentes a técnica cirúrgica utilizada	36
Figura 5	Fotografias demonstrando algumas das técnicas aplicadas durante a reabilitação dos nossos pacientes	40
Figura 6	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 1	47
Figura 7	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 2	48
Figura 8	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 3	48
Figura 9	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 4	49
Figura10	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 5	50
Figura 11	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 6	50
Figura 12	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 7	51
Figura 13	Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 1	52
Figura 14	Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 2	53
Figura 15	Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 3	54
Figura 16	Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 4	55
Figura 17	Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 5	56
Figura 18	Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 6	57
Figura 19	Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 7	58
Figura 20	Imagens do exame de ressonância nuclear magnética pós-operatória do animal 1	59
Figura 21	Imagens do exame de ressonância nuclear magnética pós-operatória do animal 2	59
Figura 22	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pós-operatória do animal 4	60
Figura 23	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 5	60

Figura 24	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 6	61
Figura 25	Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 8	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pontuação na tabela de Olby, relacionada aos achados clínicos e de marcha - São Paulo, SP – 2012	43
Tabela 2	Valores obtidos no perfil bioquímico de cada paciente, todos os valores estão dentro dos valores de referência para a espécie – São Paulo, SP – 2012	45
Tabela 3	Valores obtidos no eritrograma série vermelha de cada paciente, todos os valores estão dentro dos valores de referência para a espécie – São Paulo, SP – 2012	46
Tabela 4	Valores obtidos no eritrograma série branca de cada paciente, todos os valores estão dentro dos valores de referência para a espécie – São Paulo, SP – 2012	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Grupo experimental – São Paulo, SP – 2012	44
Quadro 2	Comparação dos exames de ressonância nuclear magnética pré e pós-operatórios dos animais selecionados para o estudo	62
Quadro 3	Dados referentes às avaliações fisioterapêuticas dos animais, de acordo com a escala de Olby, antes e após a realização do procedimento cirúrgico e injeção de células tronco – São Paulo, Sp – 2012	65

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 Evolução dos animais de acordo com a escala de Olby 66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Medula Espinhal.....	22
2.2 Doença do Disco Intervertebral	23
2.3 Células-Tronco e Terapia Celular.....	24
3 JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVO	29
4.1 Objetivo Geral.....	29
4.2 Objetivos Específicos.....	29
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1 Coleta de células da medula óssea de fetos caninos.....	30
5.2 Cultivo celular das células mononucleares da medula óssea	31
5.3 Seleção dos Casos Clínicos – Critérios de inclusão do animal no estudo	32
5.4 Exames Complementares	33
5.4.1 Técnica Radiográfica Simples.....	33
5.4.2 Ressonância Nuclear Magnética.....	33
5.5 Intervenção Cirúrgica Descompressiva da Medula Espinhal nos Cães e Transplante de Células-Tronco	34
5.6 Fisioterapia	36
5.7 Avaliação Comportamental	41
5.7.1 Teste de Avaliação Comportamental	41
6 RESULTADOS	44
6.1 Animais.....	44
6.2 Exames complementares pré-operatórios	45
6.2.1 Exames de Ressonância Nuclear Magnética pré-operatória.....	47
6.4 Procedimento cirúrgico e terapia celular:.....	51
6.5 Ressonância nuclear magnética pós-operatória:	59
Animal 4	60
6.6 Avaliação fisioterapêutica de acordo com a escala de Olby	63
6.7 Animais não selecionados	67
7 DISCUSSÃO.....	68
8 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO 1 – Modelo de Termo livre e esclarecido entregue aos proprietários dos animais selecionados para o estudo.	80

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular, especialmente quando é instalada de forma súbita, é uma das lesões mais devastadoras, do ponto de vista orgânico e psicológico, provocando em parte dos seus pacientes uma depressão acentuada (HOFFMAN et al., 2011) cujos resultados levam o médico com múltiplos desafios. A incidência em humanos é de 15 - 40 por milhão de habitantes, e geralmente afeta indivíduos no auge da idade produtiva, e embora haja uma qualidade de vida considerável em países desenvolvidos, existe um numero grande de pessoas que se tornam desabilitadas para qualquer tipo de atividade, em virtude da lesão medular (SEKHON; FEHLINGS, 2001; CRIPPS; LEE; WING, 2011). O desenvolvimento de grande parte das pesquisas terapêuticas para a lesão medular, têm sido realizados para amenizar a lesão aguda secundária (neuroproteção) (BAPTISTE; FEHLINGS, 2007), e facilitar a regeneração e / ou plasticidade (RUFF; MCKERRACHER; SELZER, 2008). Nos últimos anos, este esforço, se baseou principalmente em modelos de roedores; estes modelos produzem lesões estereotipadas, permitindo que ajam intervalos de tratamento uniforme, e geralmente têm uma semelhança em comum. Embora estes atributos ajudem a entender e aumentar o potencial de associações de resultados, eles não têm necessariamente como mimetizar a heterogeneidade no tempo e da gravidade que ocorre em seres humanos com lesão medular crônica (TATOR, 2006). A constante busca por novos modelos de lesões medulares faz o modelo canino surgir como uma alternativa bastante promissora, pois o mesmo apresenta entre suas patologias, a hérnia de disco intervertebral toracolumbar, uma doença espontânea que tem semelhanças com a lesão medular aguda em humanos. Apesar da sua elevada incidência, poucos estudos clínicos utilizaram cães com essa patologia (BALTZER et al., 2008;. BORGENS et al., 1999;. JEFFERY; LAKATOS; FRANKLIN, 2005;. LAVERTY et al., 2004).

A ocorrência de lesões medulares em cães é bastante comum, tanto por causa de acidentes automobilísticos quanto devido à doença do disco intervertebral (extrusão, protrusão discal ou explosão discal). Nestes casos, o tratamento pode ser conservador ou cirúrgico. Dentre os procedimentos cirúrgicos descritos para tratamento da doença do disco intervertebral em cães, incluem-se a fenestração ventral combinada ou não com descompressão ventral. Para o tratamento da doença do disco toracolumbar, tem sido

indicada a fenestração lateral junto a procedimentos descompressivos tais como a laminectomia e a hemilaminectomia (TOOMBS; BAUER, 1998). A fenestração do disco intervertebral remove o material discal remanescente e reduz a recorrência de extrusões, prevenindo futura doença do disco intervertebral. A cirurgia descompressiva possibilita a remoção do material discal do interior do canal medular, reduzindo a isquemia e a disfunção da medula espinhal provocada pela compressão é essencial em cães paraplégicos (TOOMBS; BAUER, 1998).

No entanto, o tratamento cirúrgico apenas é indicado para pacientes com recidiva ou progressão dos sinais, paraparesia não ambulatoria, paraplegia com preservação da dor profunda ou sua ausência com menos de 48h (SHARP; WHEELER 2005). Os animais com perda da dor profunda a mais de 48 horas, dificilmente retornam a um quadro de deambulação satisfatório, por isso a busca por novos tratamentos para animais com lesões crônicas segue como um desafio para a ciência.

Ramon e Cajal (1928) foram os primeiros autores a relatarem a dificuldade de regeneração das células do sistema nervoso central (SNC) em especial a medula espinhal, que apresenta baixo índice de recuperação das células danificadas. Somente em 1980, Richardson et al. refutaram essa ideia, realizando um experimento em ratos, onde axônios danificados do SNC regeneraram ao serem implantados no sistema nervoso periférico (SNP), provando assim a capacidade de regeneração das células do SNC.

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). Há alguma dificuldade na comparação direta destes trabalhos, devido ao grau variável de caracterização das células transplantadas, diferentes modelos animais e a variação do tempo entre a ocorrência da lesão e o tratamento (BARNABÉ-HEIDEN; FRISÉN, 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Medula Espinhal

Nos cães, a medula espinhal está localizada dentro do canal vertebral e contém raízes dorsais (sensitivas) e ventrais (motoras) que irão unir-se a saída de cada forame intervertebral e são definidas como segmento medular, formando os nervos espinhais do sistema nervoso periférico (FERNÁNDEZ; BERNARDINI 2010; LECOUTEUR; CHILD, 1992) Devido a presença de duas intumescências, a medula espinhal pode ser dividida em quatro porções: cervical, composto pelos cinco primeiros segmentos cervicais (C1-C5), cervicotorácico ou intumescência cervical (C6-T2), toracolombar (T3-L3), e lombossacral ou intumescência lombar (L4-S3); essa última compreende também a parte terminal da medula (FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010).

Na espécie canina, os discos intervertebrais são ao todo 26 e estão presentes nos corpos das vértebras com exceção do espaço entre o atlas e o axis, e na região sacral (FERNÁNDEZ; BERNARDINI 2010), representam aproximadamente 18% do comprimento da espinha sendo mais espessos nas regiões cervical e lombar, e mais estreito na coluna vertebral torácica (BRAUND, 1996), são compostos por um núcleo pulposo mais interno e um anel fibroso mais externo. (BRAY; BURBIDGE; 1998; COSTA, 2001). O núcleo é formado por uma substância gelatinosa, com grande quantidade de água e tem como principal função amortecer os impactos na coluna vertebral (COLE et al., 1985), enquanto que o anel fibroso tem em sua composição material fibrocartilagenoso e fibras elásticas. (JONHSON et al., 1984).

Os discos intervertebrais formam coxins entre as partes ósseas de vértebras adjacentes, permitindo o movimento, minimizando e absorvendo os impactos e unindo segmentos da coluna vertebral. Quando ocorre compressão do disco, o choque é absorvido pelo deslocamento do núcleo em todas as direções e pela distensão do anel. Assim, as forças são dissipadas sobre a área aumentada do anel e placas terminais cartilagenosas. O conteúdo de água do núcleo está diretamente relacionado ao seu conteúdo de proteoglicanos, que diminui com a idade. A eficiência mecânica de um disco depende da qualidade e quantidade dos componentes de sua matriz (TOOMBS; BAUER, 1995).

2.2 Doença do Disco Intervertebral

No cão o deslocamento de uma parte do disco intervertebral, origina a hérnia de disco, que normalmente é originada antes do aparecimento dos sintomas e se divide em Hansen tipo I (extrusão discal), e Hansen tipo II (protusão discal) e Hansen tipo III (explosão discal). A extrusão discal ou Hansen tipo I, é a mais comum, sendo caracterizada por uma substituição do núcleo pulposo por cartilagem hialina, tornando-o assim mais solidificado e fazendo com que o mesmo extrua através de uma fenda no anel fibroso e comprima a medula espinhal. Essa compressão é a principal causa da hipóxia e a reversibilidade do quadro é inversamente proporcional ao tempo decorrido para a realização da descompressão, sendo esse tipo de lesão mais comum em raças denominadas condrodistróficas: Teckel, Shih-tzu, Beagle, entre outras (THACHER; 1989; FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010). A protusão discal ou Hansen II está tipicamente associada à degeneração fibrosa ou metaplasia fibroide, e, a medida que o animal vai envelhecendo, o núcleo pulposo é acometido pela desidratação, no lugar de ser substituído por cartilagem hialina, é substituído por fibrocartilagem. A maior ocorrência de protusão é observada em pacientes idosos com mais de 5 anos de idade e em raças de grande porte não condrodistróficas mostrando maior incidência em cães da raça Pastor Alemão (FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010). A explosão discal ou Hansen tipo III, ocorre mais frequentemente quando um disco intervertebral saudável é sujeito a uma força excessiva breve fazendo com que o núcleo pulposo estourado atinge a medula espinhal, causando uma contusão, no entanto o material se dissipa no espaço epidural sem resultar em uma compressão. Essas extrusões ocorrem normalmente em cães durante a execução de exercício físico intenso ou em consequência de um trauma (BAGLEY, 2005). Animais com paralisia dos membros, mas que tenham ainda sensibilidade profunda preservada são candidatos à cirurgia descompressiva (descompressão ventral, hemilaminectomia, facetectomia lateral laminectomia dorsal) ou a fenestração dos discos intervertebrais.

A gravidade da lesão depende de vários fatores, quantidade de material herniado, força com que o material entra no canal medular, relação entre o diâmetro do medular e o diâmetro do canal vertebral, e nas lesões toracolombares é dividido em:

- Grau 1: Dor, resistência ao movimento sem sintomatologia neurológica.
- Grau 2: Déficit proprioceptivo bilateral, ataxia do terço superior

- Grau 3: Falta de apoio nos membros.
- Grau 4: Paraplegia.
- Grau 5 : Perda da sensibilidade a dor superficial e profunda e alteração na micção.

O tratamento desses tipos de lesão depende de vários fatores e a depender do grau pode ser conservador ou cirúrgico. O tratamento conservador indicado para os dois primeiros graus e baseado principalmente no repouso absoluto do paciente o que acarretaria uma fibrose e cicatrização do material herniado. Já para os animais dos graus 3, 4, 5 e 6 com o aparecimento dos sintomas a menos de 48 horas (SCOTT HW; MCKEE WM, 1999; FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010). Animais com perda da sensibilidade dolorosa profunda há mais de 48 horas, não são considerados candidatos à cirurgia devido à falta de expectativa de retorno à função locomotora (KNECHT, 1972; SHARP; WHEELER, 2005).

Tendo em vista essa possibilidade remota de retorno em animais considerados crônicos, a busca de uma terapia efetiva é fundamental.

2.3 Células-Tronco e Terapia Celular

As células-tronco ideais para a realização de transplantes devem ser imunologicamente inertes, provenientes de fontes de fácil acesso, possuir rápida expansibilidade em cultivo, apresentar capacidade de 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).

Hoje em dia, as células-tronco fetais mostram-se uma fonte celular bastante promissora. Elas aparecem como uma alternativa viável e com algumas vantagens em relação às células-tronco adultas e fetais, pois podem ser isoladas a partir de duas diferentes origens, do próprio feto e de estruturas extra-fetais de suporte (BOSSOLACO et al., 2006). O sangue de cordão umbilical, membrana amniótica, líquido aminótico e placenta são fontes de células-tronco fetais que se destacam neste campo.

Um dos principais tipos de célula-tronco isolada dos tecidos fetais é a célula-tronco mesenquimal, ela assim como as células-tronco mesenquimais originada de tecidos adultos

apresentam os mesmos marcadores de superfície e as mesmas características morfológicas. As células-tronco mesenquimais fetais possuem um potencial de expansão superior as células-tronco derivadas de tecidos adultos e são menos imunogênicas, pois não expressam molécula da classe III do HLA (MIAO et al., 2006).

Friedenstein et al. (1976) foram os primeiros pesquisadores a observar que a medula óssea continha células com formato de fibroblastos, denominadas MSC, que eram capazes de se diferenciar em outros tipos celulares. Desde então, vários estudos tem avançado no entendimento do fenótipo, fisiologia, potencial de diferenciação e possíveis aplicações clínicas dessas células, que podem ser expandidas *in vitro*, pois aderem em placas de cultura, e proliferam, formando colônias celulares com formato de fibroblastos (PITTENGER et al., 1999).

As MSC da medula óssea são um tipo celular promissor para uso na medicina regenerativa, devido à capacidade desse tipo celular de se diferenciar em diversos tecidos, tais como osso, cartilagem, gordura, tendões e estroma (PROCKOP, 1997).

A implantação de blocos de tecido do SNC fetal nas áreas de tecido nervoso lesado pode possibilitar o desenvolvimento de um meio favorável ao crescimento axonal (JEFFERY; BLAKEMORE, 1999). Células nervosas da bainha olfatória, encontradas no bulbo e nervo olfatórios, local de contínuo crescimento celular, utilizadas com o objetivo de promover regeneração axonal, funcionaram como suporte para a mielinização dos axônios contribuindo assim na recuperação neurológica de pacientes vítimas de lesão medular (JEFFERY et al., 2001). Outros tipos de células que podem ser transplantadas são as células de Schwann, visto que a regeneração axonal no sistema nervoso periférico ocorre mais facilmente devido a particularidades que poderiam ser aplicadas no sistema nervoso central (JEFFERY; BLAKEMORE, 1999).

Os mecanismos referentes à lesão medular, são divididos em 2 processos principais, sendo o primeiro relacionado ao trauma inicial (agudo) e o segundo referente aos processos autossustentáveis nas lesões secundárias (crônico) (BAREYRE et al., 2003; PROFYRIS et al., 2004). Durante a lesão secundária são observados, um aumento da produção de radicais livres, excessiva liberação de neurotransmissores excitatórios, e reações inflamatórias (BAREYRE; SCHWAB, 2003).

O trauma medular agudo resulta em lesão por meio de dois mecanismos. A lesão primária é decorrente das forças que causam dano mecânico instantaneamente após o evento

traumático, tais como compressão, transecção, laceração, flexão e tração (BERGMAN et al., 2000 b). Ocorre no momento do trauma e envolve a ruptura e o esmagamento de elementos neuronais e vasculares (COUGHLAN, 1993; BRAUND, 1994). Inclui a ruptura e degeneração do segmento distal do axônio (que é isolado do corpo da célula neuronal), dos corpos celulares nervosos e das estruturas de suporte (células da glia) resultando em interrupção fisiológica e/ou morfológica dos impulsos nervosos (RUCKER, 1990; BAGLEY et al., 1999).

Existem quatro mecanismos básicos na lesão aguda à medula espinhal: interrupção anatômica, compressão, concussão e isquemia. A interrupção anatômica do parênquima da medula espinhal é a laceração física do tecido nervoso, cujos efeitos são considerados como não tratáveis e irreversíveis (KRAUS, 2000). A compressão medular decorrente da presença de uma massa conduz ao aumento da pressão no interior do canal vertebral. É comumente causada por extrusão de disco ou tumores, acometendo primeiramente a substância branca da medula espinhal (BAGLEY et al., 1999; KRAUS, 2000). A quantidade de compressão medular decorrente da extrusão de disco é determinada pela massa do núcleo extruído degenerado dentro do canal, da proporção do diâmetro do canal vertebral em relação ao diâmetro da medula espinhal e da quantidade relativa de desidratação do disco intervertebral degenerado (SHORES, 1992).

A compressão crônica pode decorrer de neoplasias de crescimento lento, protrusão crônica de disco intervertebral, ou de doenças congênitas e degenerativas das vértebras, como por exemplo a espondilomielopatia cervical caudal (OLBY; JEFFERY, 2003). Muitas vezes pode haver sobreposição das lesões, ocorrendo lesão contusa aguda e compressão crônica. Neste tipo de compressão existem várias diferenças fisiológicas, quando comparado às desordens traumáticas agudas (PLATT; ABRAMSON; GAROSI, 2005).

Na compressão crônica, o fluxo sanguíneo e os níveis de oxigênio são frequentemente mantidos na medula espinhal. A principal alteração que ocorre nestes casos é a desmielinização e edema axonal, e somente mais tarde a substância branca se torna edemaciada devido à ocorrência de edema vasogênico, o que por sua vez aumenta a compressão medular (PLATT; ABRAMSON; GAROSI, 2005).

A evidência da existência de células-tronco multipotentes neural na medula espinhal do adulto é amplamente baseada em estudos *in vitro*. Células com capacidade de auto-renovação contínua e com potencial de diferenciação em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos podem ser propagadas “*in vitro*” (JOHANSSON et al., 1999; SHIHABUDDIN et al., 1997; WEISS et al., 1996). Tais células com propriedades neurais

de células-tronco, estão presentes em todo o eixo rostrocaudal da medula espinhal adulta (SHIHABUDDIN et al., 1997; WEISS et al., 1996).

No entanto a quantidade dessas células-tronco não é suficiente para uma recuperação, dependendo do grau da lesão, assim o transplante de células-tronco é uma estratégia potencial para promover a recuperação da função após a lesão medular em vários estudos, utilizando células-tronco de várias espécies (CUMMINGS et al., 2005; KEIRSTEAD et al., 2005; KARIMI-ABDOLREZAEI et al., 2006; VICTORIA et al., 2009; TARASENKO et al., 2009).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o uso da terapia celular com células-tronco mesenquimais da medula óssea de fetos caninos em cães com lesão medular compressiva causada por extrusão ou prolapso do disco intervertebral toracolombar. Estes animais foram selecionados em clínicas veterinárias de acordo com a apresentação da doença. Pretendemos utilizar animais com ausência de sensação dolorosa profunda dos membros pélvicos há pelo menos 6 meses. Esses animais não seriam candidatos a cirurgia descompressiva, por apresentarem poucas chances de retorno da deambulação normal.

3 JUSTIFICATIVA

A grande casuística de animais com doença do disco intervertebral na clínica veterinária fornece modelos animais perfeitos para o estudo da terapia celular em lesões medulares. Além disso, tendo em vista a falta de tratamentos convencionais eficientes para cães que possuem este tipo de lesão, é de suma importância buscar novas terapêuticas eficientes para a solução do problema. É importante ressaltar que a importância destes estudos aumenta se levarmos em consideração que em humanos não existe tratamento efetivo para lesões medulares crônicas e que resultados eventualmente positivos podem subsidiar o aprimoramento do tratamento no homem.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

Avaliar clinicamente cães com lesão medular compressiva toracolombar crônica, submetidos à aplicação de células tronco de medula óssea de fetos caninos.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar mediante teste comportamental a evolução clínica dos animais transplantados;
- Avaliar o potencial terapêutico das células-tronco da medula óssea de fetos caninos em animais portadores de lesão medular toracolombar compressiva crônica;
- Avaliar através de ressonância magnética uma possível reconstituição da imagem da medula espinhal dos animais tratados

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta de células da medula óssea de fetos caninos

Para a coleta da medula óssea fetal canina, foram utilizados úteros de fêmeas gravídicas oriundas de campanhas de castração, efetuadas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de São Paulo. Os úteros foram coletados mediante a realização de ovarioanpingohisterectomia nas fêmeas devidamente sedadas com 0,1 mg/Kg de acepromazina (Acepran, Univet, São Paulo), 0,5 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí) e 20 mg/Kg de quetamina (Dopalen, Vetbrands, Jacareí). O material coletado foi armazenado em gelo e transportado para a FMVZ-USP para ser processado. Os úteros foram seccionados para a remoção dos fetos. Para o isolamento das células da medula óssea foi realizado, primeiramente a coleta de medula óssea mediante a dissecação do membro pélvico e torácico. Após remoção do fêmur, tíbia, rádio e ulna, foram removidas as epífises proximais e distais (Figura 1 A) e o canal medular foi lavado com auxílio de seringa (Figura 1 B) contendo meio de cultivo (DMEM-High) e antibiótico (estreptomicina a 1%).

O título da figura vem na parte superior da imagem.

Figura 1 – Fotografias demonstrando o processo utilizado para obtenção da medula óssea fetal

Figura 1- Fotografia do procedimento de coleta da medula óssea fetal canina. Em A notamos a retirada das epífises proximal e distal (setas azuis) para acesso ao conteúdo interno, em B notamos a injeção de meio de cultivo dentro do osso (*flushing*) para obtenção da medula óssea fetal

5.2 Cultivo celular das células mononucleares da medula óssea

As células extraídas da medula óssea foram cultivadas em placas de cultivo de 30mm de diâmetro onde após um período de 24 horas, dado esse intervalo, o sobrenadante foi desprezado (meio de cultivo + células flutuantes) (Figura 2 A) e a placa de cultivo lavada duas vezes com PBS-L, a fim que permanecessem apenas as células aderentes da medula óssea (Figura 2 B). Todas as placas foram então incubadas sob as mesmas condições de cultivo a 37,0° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

O meio de cultivo utilizado foi composto de DMEM – HIGH, 1 % de estreptomicina, 1 % de Piruvato, 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de aminoácidos não essenciais

Figura 2 – Fotomicrografia das células flutuantes que foram desprezadas (A) e células-tronco indiferenciadas (B)

Figura 2: Em A podem os notar uma fotografia da placa de cultivo contendo várias células flutuantes, essas células foram desprezadas para que permanecessem apenas as células aderentes da medula óssea em B podem os notar as células-tronco indiferenciadas de medula óssea fetal canina, bastante confluentes, com formato fibroblastoide, já em sua sétima passagem (P7) e pronta para ser injetada nos pacientes com lesões medulares

5.3 Seleção dos Casos Clínicos – Critérios de inclusão do animal no estudo

Foram utilizados sete cães provenientes de diferentes clínicas veterinárias particulares de São Paulo, portadores de lesão medular crônica. Os animais selecionados apresentaram o quadro clínico a seguir:

- Paraplegia;
- Ausência de propriocepção consciente;
- Ausência de sensibilidade dolorosa profunda com presença do reflexo podal ou retirada nos membros pélvicos;
- Diagnóstico de compressão medular toracolombar dos discos intervertebrais compreendidos entre os segmentos T10 até L3 após ressonância nuclear magnética.

Foram considerados casos crônicos animais com perda da sensibilidade dolorosa profunda há mais de 60 dias. Os proprietários assinaram termo de compromisso (Anexo 1) em que afirmam estar de acordo com o procedimento e cientes de todos os riscos inerentes a cirurgia e o transplante celular.

5.4 Exames Complementares

Os animais foram submetidos a todos os exames pré-operatórios convencionais (hemograma, bioquímico, sumário de urina, coproparasitológico) além de eletrocardiograma. Quando necessário, os mesmos foram submetidos à exame radiográfico simples da coluna vertebral, ultrassom abdominal e ecocardiograma. Todos foram submetidos à ressonância nuclear magnética para uma localização precisa da lesão e visualização do aspecto medular. Os exames foram realizados em conjunto para um diagnóstico efetivo da lesão.

5.4.1 Técnica Radiográfica Simples

Para a realização das radiografias da coluna vertebral os animais foram posicionados em decúbito lateral direito para a obtenção de projeções latero-laterais. As projeções toracolombar ou lombossacra foram realizadas de acordo com a suspeita clínica do médico veterinário responsável pelo atendimento do animal, através de anamnese, exame físico e neurológico do animal.

A técnica radiográfica foi adequada através da relação quilovoltagem, miliamperagem e espessura da área corporal a ser radiografada.

5.4.2 Ressonância Nuclear Magnética

A escolha da ressonância nuclear magnética para obter o diagnóstico, foi devido ao fato de mesma ser considerada padrão “ouro” em avaliação de problemas neurológicos o que possibilita a análise do exame sem sobreposição de imagens facilitando assim o diagnóstico. O mesmo protocolo anestésico descrito para a intervenção cirúrgica descompressiva dos cães, foi utilizado para a realização dos exames de ressonância. Os pacientes foram posicionados em decúbito ventral (Figura 3). Todos os exames foram feitos na coluna

vertebral, porção toracolombar em sequência sagitais e transversais ponderadas em T2 e “3DHYCE” e dorsais em “STIR”.

Figura 3 – Animal devidamente sedado e preparado durante a realização do exame de ressonância nuclear magnética

Figura 3: Animal posicionado em decúbito lateral direito, sob efeito de anestesia durante a fase de preparo para a realização do exame de ressonância nuclear magnética

5.5 Intervenção Cirúrgica Descompressiva da Medula Espinhal nos Cães e Transplante de Células-Tronco

Inicialmente os animais receberam como pré-medicação anestésica 0,05 mg/Kg de aceprom (Acepromazina^{®1}) associada a 4 mg/Kg dolosal (Meperidina^{®2}) via intramuscular (IM) e após 15 minutos foram induzidos à anestesia geral inalatória (Figura 4) com 5mg/Kg de propofol (Propovan^{®3} - Cristália) por via intravenosa (IV), sendo mantidos com Isoflurano (Isoforine^{®4}- Cristália). Durante procedimento cirúrgico os animais foram submetidos hemilaminectomia dorsolateral no local da lesão medular. A incisão foi realizada lateralmente à linha média dorsal à lesão, a qual foi previamente identificada com auxílio do exame de ressonância nuclear magnética. Após incisão completa da pele e músculos (Figura 4), foi incisada a fáscia lombodorsal ao lado dos processos espinhosos das

vértebras correspondentes, e, com auxílio de um elevador de perióstio foram isolados os processos espinhosos desejados. Ao expor a superfície dorsal do processo articular, realizou-se uma janela para acesso ao canal vertebral (Figura 4). Primeiramente foi identificada a massa medular comprimida, para posterior remoção do tecido lesionado (Figura 4). Após durotomia foi realizada a injeção de 1×10^6 de células-tronco oriundas de medula óssea fetal canina, intramedular em três pontos distintos: cranialmente à lesão, diretamente sobre o foco da lesão e caudalmente à lesão. Optamos por aplicar as células no foco da lesão pois acreditamos que a cronicidade da lesão dos nossos pacientes poderia impedir a produção de fatores quimiotáticos suficientes para o recrutamento destas células, no caso de uma aplicação sistêmica. O processo pós-operatório consistiu na terapia com kefazol^{®5} (cefazolina sódica) 30mg/Kg/BID, meloxicam 0,1mg/Kg/SID (Genéricos Biosintética) e Tramal^{®6} (cloridrato de tramadol) 2mg/Kg/TID durante 7 dias.

Figura 4 – Fotografias referentes a técnica cirúrgica utilizada.

Figura 4: Protocolo cirúrgico, em A observamos o paciente sob anestesia geral, em B notamos a incisão completa de pele e músculos, em C a realização da janela para permitir o acesso à medula espinhal, e em D a retirada do material herniado que estava comprimindo a medula espinhal.

5.6 Fisioterapia

Após realizadas as cirurgias, os animais foram submetidos a sessões de fisioterapia e reabilitação com a finalidade de maximizar o efeito do tratamento com células, promovendo o fortalecimento da musculatura, estimulando as vias nervosas, diminuindo a tensão muscular, estimulando a propriocepção e relaxando as articulações (Figura 5).

Esteira Aquática: A esteira aquática é um equipamento da mais alta tecnologia, cujo objetivo é proporcionar um tratamento de reabilitação e condicionamento físico monitorado ao animal. A reabilitação na esteira associa as propriedades físicas da água, principalmente a pressão hidrostática, flutuação e viscosidade, aos efeitos do calor, proporcionando aos pacientes efeitos fisiológicos benéficos que surgem imediatamente após a imersão. Uma grande vantagem da esteira aquática é o estímulo que ela provoca nos 4 membros, ou seja, o

animal não se “acomoda” (boiar, parar de movimentar os posteriores, etc.) durante o exercício, fato que pode ocorrer com alguns animais durante a natação.

Ultrassonografia Terapêutica: É um tratamento que consiste da utilização de ondas sonoras longitudinais específicas para a reabilitação e não audíveis à orelha humana. Essas ondas ultra-sônicas são produzidas a partir da transformação da corrente elétrica comercial em corrente de alta frequência, que ao incidir sobre um cristal de quartzo ou de zirconato - titanato de chumbo (ZTP), provoca compressão e expansão alternada do cristal. Esta ação mecânica (pressão), sobre o cristal, provoca a emissão de ondas ultra-sônicas com frequência igual à corrente recebida ou corrente que incide sobre o cristal dentro do transdutor (efeito piezoelétrico). O cristal sintético (ZTP) é mais resistente a altas temperaturas e mais maleável, aumentando com isto a durabilidade e a emissão do feixe. Transdutor é um dispositivo capaz de transformar uma forma de energia em outra, no caso, elétrica em mecânica. As principais funções do ultrassom são:

- 1- Função Térmica: Este efeito é decorrente da absorção das ondas ultrassônicas pelo tecido e sua transformação em calor. Este fator decorre também da vibração celular e de suas partículas, provocando atrito entre si, produzindo o efeito térmico. O ultrassom de feixe contínuo produz maior quantidade de calor. Feixe ultrassônico (vibração molecular ==> fricção ==> Atrito de partículas -->, calor). A produção de calor é maior nas áreas limítrofes músculo/osso, devido à reflexão das ondas ultrassônicas, das ondas estacionárias (refletem e sobrepõem-se) e da formação das ondas transversais (movimentos de partículas perpendiculares ao feixe: osso).
- 2- Hiperemia: Resulta da ação do US sobre os plexos terminais nervosos, que, ao serem estimulados, produzem vasodilatação reflexa dos capilares e arteríolas. Concomitante a isso acontece o aumento do metabolismo e do fluxo sanguíneo, produzindo também hiperemia. Produz estimulação nervosa aferente, provocando depressão pós-excitatória da atividade do sistema nervoso ortossimpático, produzindo relaxamento muscular e vasodilatação. O ultrassom produz aumento da permeabilidade da membrana celular ao cálcio, que devido ao aumento intracelular rompe o mastócito (degranulação mastocitária) liberando histamina - vasodilatação. Os movimentos peristálticos, dos vasos, aumentam em dez vezes ao serem estimulados pelo ultra-som.

3- Ação antiinflamatória: Acelera a resposta inflamatória do processo de reparação, promovendo a liberação de histamina, macrófagos e monócitos, além de incrementar a síntese de fibroblastos e colágeno.

4- Melhora do retorno venoso e linfático: Aumento da permeabilidade celular, aumento da circulação e a micromassagem produzida pelo ultrassom, influenciam e auxiliam o retorno venoso e linfático, favorecendo a reabsorção de edemas e de irritantes tissulares (menor efeito nociceptivo). Reduz o tempo da fase inflamatória, acelerando a fase proliferativa.

5- Ação Mecânica: As ondas ultrassônicas, ao penetrarem nos tecidos, provocam uma vibração celular (micromassagem), produzindo o aumento da permeabilidade de sua membrana, acelerando assim, a velocidade de difusão iônica através dela. As correntes acústicas provocam o aumento da permeabilidade da membrana celular, ativando o segundo mensageiro, aumentando a síntese de proteína e o aumento da secreção dos mastócitos. Altera os movimentos dos fibroblastos e aumenta absorção de cálcio. Os fatores de crescimento dos macrófagos são aumentados, contribuindo com a aceleração do processo de reparo. Acelera os processos osmóticos, regulando os desequilíbrios em nível celular, nos casos de lesões ou enfermidades.

6- Função Química: O ultrassom atua como catalisador, acelerando as reações químicas, e aumentando a condutibilidade das reações. Produz pH alcalino pelo aumento da circulação e das trocas.

7- Ação tixotrópica ou coloidoquímica: Transforma colóide gelem sol o que aumenta a elasticidade dos tecidos que carecem de água, favorecendo a hidratação tecidual. O fator fibrinolítico decorrente da ação tixotrópica ou coloidoquímica que transforma colóide gel em sol, hidratando os tecidos, favorecendo a extensibilidade dos tecidos conjuntivos (colágeno), pelo aumento da viscoelasticidade. Decorre também da ação térmica e pela micro massagem (vibração).

8- Efeito Regenerador: Ativa a formação de novos capilares (angiogênese) e o aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos expostos ao ultrassom. Na fase proliferativa e de remodelação, o ultrassom auxilia na reorganização (arranjo e alinhamento) do colágeno, o que se deve ao efeito piezoelétrico. Os movimentos do transdutor, no sentido das fibras, aceleram esta orientação aumentando o metabolismo celular e o transporte de íons cálcio.

9- Efeito Analgésico: Decorre da diminuição da excitabilidade das fibras nervosas aferentes sensitivas, através do aumento do seu limiar de despolarização, provocando diminuição dos estímulos dolorosos e agindo sobre a membrana plasmática do neurônio, diminuindo a atividade da bomba de sódio e potássio. A analgesia também é produzida pelo aumento da defesa, pelo relaxamento muscular (menor atividade ortossimpática), pela melhora da circulação, pela regeneração tecidual. As ações térmicas e da micromassagem produzem ações analgésicas. A normalização do pH local tem influência direta na analgesia.

10- Ação Relaxante: A diminuição do tônus muscular decorre da micromassagem, do efeito térmico (calor) e da diminuição da atividade do sistema nervoso ortossimpático, que provocam relaxamento.

11- Reflexo Paravertebral: Ao nível paravertebral segmentar, estimula os dermatômos. No caso, o que interessa é o estímulo mecânico, que é conseguido com potência baixa ou ondas ultrasônicas pulsadas. A estimulação PVR produz reflexamente aumento da circulação segmentária.

12- Efeito antiacidótico: Decorre da estimulação da circulação dos fluidos tissulares, fazendo com que o pH local torne-se menos ácido. Diminui as isquemias (angiogênese), o que aumenta a circulação local e a reabsorção do ácido láctico.

13- Efeito Angiogênico: Favorece o desenvolvimento de novos capilares, através da ativação de células endoteliais (MACHADO, 2002; ROBINSON; SNYDER, 2001; THOMSON et al., 1994).

Goniometria: A goniometria é uma ferramenta de mensuração objetiva e deve fazer parte do exame ortopédico. O instrumento mais utilizado é o goniômetro universal, de plástico ou metal, que é composto de um corpo semelhante a um transferidor e duas extensões denominadas de braços, sendo um estacionário e um que se move no momento da aferição. O método permite medir a máxima flexão e a máxima extensão de uma articulação, assim como a amplitude do movimento. Além disso, a goniometria possibilita avaliar a evolução após procedimentos cirúrgicos ortopédicos e de reabilitação.

Figura 5 – Fotografias demonstrando algumas das técnicas aplicadas durante a reabilitação dos nossos pacientes

Figura 5 - Fotografias demonstrando as técnicas utilizadas nas sessões de fisioterapia: Em A, podemos observar a medição de amplitude articular através da goniometria, em B a utilização de um eletroestimulador de vias nervosas, em C um aparelho para relaxamento de musculatura e em D o animal sendo submetido ao estímulo na esteira aquática.

5.7 Avaliação Comportamental

Para se avaliar de forma mais precisa a recuperação de cães com lesão de medula espinhal submetidos a diferentes tratamentos, foi desenvolvido um teste comportamental que analisa diversos parâmetros relacionados a movimentação articular, propriocepção, distribuição de peso nos membros, coordenação motora, que utiliza uma escala de pontos, e pontua cada animal antes e depois do tratamento de acordo com o grau de melhora observado. Esse teste foi utilizado para avaliar a recuperação funcional dos membros pélvicos nos cães com lesão medular crônica. Com a finalidade de se observar a deambulação e o grau de comprometimento, cada cão foi filmado por um mínimo de 10 “passos” de cada lado e por trás ao caminhar em piso comum. Como os animais não conseguiam sustentar o próprio peso, foram auxiliados por nós com a utilização de um suporte passado através da pelve para suportar seus membros posteriores. Utilizando uma escala analógica de 14 pontos (Escala de Olby - Tabela 1), a marcha dos cães foi pontuada por três expectadores (fisioterapeutas veterinários) avessos ao experimento através das filmagens individuais de cada animal. Uma pontuação média foi obtida após 4, 8 e 12 semanas após o transplante das células-tronco da medula óssea fetal canina (OLBY et al., 2001).

5.7.1 Teste de Avaliação Comportamental

Orientações:

Para que este teste fosse realizado, houve o consentimento dos proprietários. Primeiramente, filmamos todos os cães, os animais que não conseguiram suportar o próprio peso do corpo, foram filmados tendo seu peso traseiro suportado com nosso auxílio , permitindo desta forma movimentos voluntários dos membros pélvicos. Os cães foram

considerados como capazes de suportar o próprio peso quando eles suportaram o seu peso total com as articulações estendidas por pelo menos dois passos

Após a filmagem dos cães, avaliamos a presença de sensação dolorosa profunda pressionando com o auxílio de uma pinça, o leito ungueal dos dígitos (nos casos onde a presença de dor profunda foi questionável, repetimos o procedimento em cada dígito e na cauda).

Tabela 1 - Pontuação na tabela de Olby, relacionada aos achados clínicos e de marcha - São Paulo, SP – 2012

Pontuação	Descrição Clínica
0	Ausência de movimento dos membros pélvicos sem sensação de dor profunda
1	Ausência de movimento dos membros pélvicos com sensação de dor profunda.
2	Ausência de movimento dos membros pélvicos mas com movimentos voluntários da cauda.
3	Mínima protração (movimento de uma articulação) do membro pélvico sem deslocamento de peso
4	Protração dos membros pélvicos sem deslocamento de peso em uma articulação por pelo menos 50% do tempo
5	Protração dos membros pélvicos sem deslocamento de peso em uma articulação por mais de 50% do tempo
6	Protração dos membros pélvicos com deslocamento do peso em menos de 10% do tempo
7	Protração dos membros pélvicos com deslocamento do peso em 10 a 50% do peso do tempo
8	Protração dos membros pélvicos com deslocamento do peso em mais de 50% do tempo
9	Protração dos membros pélvicos com deslocamento do peso em 100% do tempo com força reduzida dos membros pélvicos. Mais de 90% de erro ao caminhar (por exemplo: Cruzando os membros pélvicos, andar arrastando os pés, permanecer em estação com os dorsos dos pés, tropeçar).
10	Protração dos membros pélvicos com deslocamento do peso em 100% do tempo com força reduzida dos membros pélvicos. Erros em 50 a 100% do tempo
11	Protração dos membros pélvicos com deslocamento do peso em 100% do tempo com força reduzida dos membros pélvicos. Erros em menos de 50% do tempo
12	Marcha atáxica dos membros pélvicos com força normal, mas com erros em mais de 50% do tempo (por exemplo: falta de coordenação dos membros torácicos, cruzar os membros pélvicos, saltando etapas, salto de coelho, andar arrastando os pés na protração)
13	Marcha atáxica dos membros pélvicos com força normal, erros em menos de 50% do tempo
14	Marcha dos membros pélvicos normal

6 RESULTADOS

6.1 Animais

Foi realizado procedimento cirúrgico com aplicação de células-tronco em sete cães com raças e idades variadas, com lesões toracolombares, resultantes de trauma ou extrusão de disco intervertebral (Quadro 1). Após a realização dos exames pré-operatórios, os animais foram submetidos a uma análise clínica por 3 fisioterapeutas, que avaliaram vários aspectos relacionados ao movimento dos membros pélvicos, propriocepção e resposta a estímulos dolorosos. Com os resultados obtidos nas avaliações, pontuamos os animais de acordo com a escala de Olby. As mesmas avaliações foram repetidas aproximadamente 90 dias após a cirurgia.

Quadro 1 - Grupo experimental – São Paulo, SP – 2012

Animal	Idade	Raça	Diagnóstico	Altura da Lesão
1	6 anos	Teckel	Extrusão de disco intervertebral	T13-L1
2	8 anos	Teckel	Extrusão de disco intervertebral	T13-L3
3	6 anos	Lhasa Apso	Extrusão de disco intervertebral	T11-T12
4	2 anos	S.R.D	Trauma	T10-T11
5	8 anos	Poodle	Extrusão de disco intervertebral	L1-L4
6	10 anos	Teckel	Extrusão de disco intervertebral	T11-T12
7	6 anos	Teckel	Extrusão de disco intervertebral	T12-L2

6.2 Exames complementares pré-operatórios

Todos os animais utilizados apresentaram valores hematimétricos (Tabela 2), leucométricos (Tabela 3) e bioquímicos séricos (Tabela 4) dentro dos parâmetros de normalidade. Adicionalmente, os exames de eletrocardiograma e ecocardiograma não apresentaram alterações dignas de nota. A obtenção destes exames foi o primeiro passo para a continuidade do estudo, uma vez que nos forneceu dados que nos possibilitaram encaminhar o animal para o exame de ressonância magnética onde o mesmo foi anestesiado. A realização de um protocolo anestésico sem a realização dos exames pré-operatórios potencializaria o já existente risco anestésico.

Tabela 2 - Valores obtidos no perfil bioquímico de cada paciente, todos os valores estão dentro dos valores de referência para a espécie – São Paulo, SP - 2012

Animal	Uréia mg/dl	Creatinina mg/dl	Fosfatase Alcalina UI/L	ALT(TGP) UI/L
1	16,0	0,8	80,0	20,0
2	32,0	1,0	24,0	68,0
3	22,0	1,3	94,0	31,0
4	16,0	1,1	63,0	45,0
5	23,0	1,4	47,0	85,0
6	42,0	1,3	34,0	54,0
7	47,0	0,9	87,0	18,0
Valores de Referência	10 a 60	0,5 a 1,6	10 a 96	7 a 92

Tabela 3 - Valores obtidos no eritrograma série vermelha de cada paciente, todos os valores estão dentro dos valores de referência para a espécie – São Paulo, SP - 2012

Animal	Eritrócitos milhões/mm ³	Hemoglobina g%	Hematócrito g%	Proteínas Totais g%
1	5,5	13,6	41	6,6
2	7,0	16,7	50	7
3	6,3	15,1	49	6,3
4	5,8	16,3	46	6,7
5	6,8	15,3	48	7,5
6	4,3	17,8	45	7,3
7	5,1	18,3	53	6,2
Valores de Referência	4 a 7	14 a 19	45 a 56	6 a 8

Tabela 4 - Valores obtidos no eritrograma série branca de cada paciente, todos os valores estão dentro dos valores de referência para a espécie – São Paulo, SP - 2012

Animal	Leucócitos %	Segmentados %	Bastonetes %	Eosinófilos %
1	8,300	63	0	4
2	9,700	65	0	4
3	11,900	65	0	9
4	11,000	70	0	5
5	12,300	58	1	2
6	11,900	62	0	7
7	14,000	77	0	3
Valores de Referência	8,000 a 16,000	55 a 80	0 a 1	1 a 9

6.2.1 Exames de Ressonância Nuclear Magnética pré-operatória

Com o intuito de identificar com precisão o local da lesão, todos os animais foram submetidos a realização do exame de ressonância nuclear magnética antes do procedimento cirúrgico, durante a realização do exame, não foi observada nenhuma intercorrência. Vale ressaltar que para um diagnóstico preciso da lesão, a análise das imagens foi feita em conjunto e em diversas sequências por isso, as imagens colocadas abaixo são mais com o intuito de ilustrar a lesão e não para demonstrar toda ela

Animal 1

Durante a realização do exame, o animal permaneceu anestesiado e em decúbito lateral direito, o procedimento durou cerca de 2:30h desde o momento da aplicação da medicação pré-anestésica até a alta do paciente, foram realizadas sequências sagitais e transversais e as imagens mostram as lesões encontradas na medula espinhal (Figura 6).

Figura 6 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 1

Figura 6: As imagens da ressonância nuclear magnética da coluna vertebral, no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: diminuição do sinal multifocal em diferentes graus ao longo de toda a coluna torácica, mielopatia extradural compressiva ventrolateral direita em T13-L1, com presença de siringomielia secundária, e em T9-T10, porém, menos acentuada que na lesão anterior

Animal 2

Durante a realização do exame, o animal permaneceu anestesiado e em decúbito lateral direito, o procedimento durou cerca de 1:30h desde o momento da aplicação da medicação pré-anestésica até a alta do paciente, foram realizadas sequências sagitais e transversais e as imagens mostram as lesões na medula espinhal (Figura 7).

Figura 7 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 2

Figura 7: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: Hiperintensidade homogênea entre T13-L3, com siringohidromielia concomitante, desidratação discal multifocal

Animal 3- Durante a realização do exame, o animal permaneceu anestesiado e em decúbito lateral direito, o procedimento durou cerca de 2:00h desde o momento da aplicação da medicação pré-anestésica até a alta do paciente, foram realizadas sequências sagitais e transversais e as imagens mostram as lesões na medula espinhal (Figura 8).

Figura 8 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 3

Figura 8: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: presença de hiperintensidade homogênea de medula espinhal na altura de T11-T13, com leve hidromielia caudal, tratando-se de um achado não específico. Considerando a natureza crônica dos sinais clínicos relatados, os principais diagnósticos diferenciais foram relacionados à fibrose medular e mielomálica. Entre L7 – S1, sugere-se um a compressão de raiz nervosa esquerda. Adicionalmente, é possível observar desidratação discal multifocal

Animal 4- Durante a realização do exame, o animal permaneceu anestesiado e em decúbito lateral esquerdo, o procedimento durou cerca de 2:30h desde o momento da aplicação da medicação pré-anestésica até a alta do paciente (essa ressonância durou um pouco mais, pois o animal foi acometido por trauma e optamos por analisar a medula como um todo), foram realizadas sequências sagitais e transversais e as imagens mostram as lesões na medula espinhal (Figura 9).

Figura 9 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 4

Figura 9: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: Fratura antiga de T10, com provável má união vertebral e subluxação dorsal em T10-T11, causando compressão medular com ressecção medular parcial e/ou atrofia medular focal, devido a cronicidade da lesão, é provável a presença de leve gliose focal na altura de T10-T11. Adicionalmente, nota-se degeneração discal neste espaço, provavelmente secundária à fratura.

Animal 5- Durante a realização do exame, o animal permaneceu anestesiado e em decúbito lateral direito, o procedimento durou cerca de 1:40h desde o momento da aplicação da medicação pré-anestésica até a alta do paciente, foram realizadas sequências sagitais e transversais e as imagens mostram as lesões na medula espinhal (Figura 10).

Figura 10 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 5

Figura 10: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: hipersinal medular focal associada a siringomielia na altura da epífise cranial de L1 (dada a cronicidade da lesão clínica, o hipersinal medular provavelmente representa gliose focal), prévia intervenção cirúrgica a direita entre L1-L4, discretas protusões discais entre T13-L3 sem compressão medular significativa, atrofia muscular paravertebral lombar direita e desidratação/degeneração discal multifocal em coluna toracolumbar

Animal 6- Durante a realização do exame, o animal permaneceu anestesiado e em decúbito lateral direito, o procedimento durou cerca de 1:20h desde o momento da aplicação da medicação pré-anestésica até a alta do paciente, foram realizadas sequências sagitais e transversais e as imagens mostram as lesões na medula espinhal (Figura 11).

Figura 11 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 6

Figura 11: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: mielopatia extradural compressiva ventrolateral esquerda severa entre T11-T12, protusão discal leve em L3-L4 sem compressão medular importante, desidratação/degeneração discal multifocal e espondiloses leves multifocais em coluna torácica caudal e lombar

Animal 7- Durante a realização do exame, o animal permaneceu anestesiado e em decúbito lateral direito, o procedimento durou cerca de 1:50h desde o momento da aplicação da medicação pré-anestésica até a alta do paciente, foram realizadas sequências sagitais e transversais e as imagens mostram as lesões na medula espinhal (Figura 12).

Figura 12 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 7

Figura 12: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: Hiper sinal medular grave da altura de T12 a L4 não é específico,iringohidromielia associada de T12 a L1 (dada a cronicidade dos sinais clínicos reportados, atrofia medular associada a gliose e/ou mielomálacia são os principais diferenciais para este achado), prévia intervenção cirúrgica na porção esquerda da lâmina vertebral de T13-L1, com associada dilatação cística/pseudocística sacular meníngea focal, ou, menos provável, abscesso; desidratação / degeneração de todos os discos intervertebrais presentes no estudo.

6.4 Procedimento cirúrgico e terapia celular:

Durante os procedimentos cirúrgicos, foi possível identificar os locais lesionados e realizar a aplicação das células-tronco de medula óssea fetal canina.

Animal 1

Após a anestesia, o animal foi posicionado em decúbito lateral direito. Foram realizadas uma incisão e divulsionamento da musculatura adjacente, tornando possível a visualização e isolamento dos processos espinhosos das vértebras correspondentes. Em seguida realizou-se uma janela para acesso ao canal vertebral, por onde identificou-se o material que estava comprimindo a medula espinhal. O material foi retirado. Particularmente neste animal encontrou-se um grânulo fibroso aderido a medula espinhal. Após a retirada desse grânulo pode-se observar uma relaxamento da medula espinhal (Figura 13).

Figura 13 – Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 1

Figura 13. Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico do animal 1. Em A, pode-se notar o aspecto “murchado” da medula espinhal o que nos trouxe um prognóstico mais reservado em relação a recuperação desse paciente. Em B nota-se um grânulo fibroso que estava aderido na medula espinhal. Em C a aplicação das células-tronco em um dos 3 locais pré-determinados e em D a colocação de gordura subcutânea com o intuito de cobrir a medula espinhal nos locais da aplicação das células-tronco

Animal 2

O animal foi anestesiado e colocado em decúbito lateral direito. Ao realizar a incisão notou-se uma dificuldade em visualizar a medula espinhal, pois o animal apresentava uma grande quantidade de gordura subcutânea. Feita a janela no canal vertebral, o material extruído foi identificado e retirado, para em seguida serem aplicadas as células-tronco (Figura 14).

Figura 14 - Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 2

Figura 14. Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico do animal 2. Em A, nota-se uma grande quantidade de gordura subcutânea o que dificultou o acesso à medula espinhal. Em B nota-se o aspecto "murcha" da medula espinhal o que sugeriu um prognóstico mais reservado em relação a recuperação deste paciente. Em C evidencia-se a aplicação das células-tronco e em D, nota-se a colocação de gordura subcutânea com o intuito de cobrir a medula espinhal nos locais da aplicação das células-tronco

Animal 3

Após o procedimento anestésico, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo, tornando possível o divulcionamento da musculatura e acesso à medula espinal, observamos na mesma um aspecto homogêneo da medula, o que sugeriu um prognóstico favorável para este animal (Figura 15).

Figura 15 - Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 3

Figura 15: Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico do animal 3. Em A acesso a medula espinal. Em B podemos observar o aspecto turgido e homogêneo da medula espinal. Em C e D nota-se a aplicação das células-tronco diferentes locais.

Animal 4

Após a anestesia, o animal foi posicionado em decúbito ventral. Esta diferença de posicionamento ocorreu devido ao fato de que a compressão da medula espinhal nesse caso não ocorreu por conta de extrusão discal, mas sim devido a uma subluxação vertebral. Após a visualização da medula espinhal foi feita um durotomia para aplicação da células-tronco. Este procedimento evidenciou uma desorganização na morfologia da medula espinhal oriunda da formação da cicatriz glial (Figura 16).

Figura 16 - Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 4

Figura 16: Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico do animal 4. Em A pode-se notar o aspecto turgido e homogêneo da medula espinhal, o que sugeriu um prognóstico favorável para a recuperação do animal após o tratamento com células-tronco. Em B e C pode-se evidenciar a cicatriz no local preciso da lesão, com interrupção do fluxo sanguíneo, em D nota-se a aplicação das células-tronco

Animal 5

Após a anestesia, o animal foi posicionado em decúbito ventral onde após seccionamento da musculatura adjacente foi possível observar a medula espinhal (nesse caso não foi necessário a retirada da lamina óssea, pois o animal já havia sido operado anteriormente, facilitando assim o acesso). Durante o ato cirúrgico, foi possível observar o aspecto de necrose da medula espinhal o que antes mesmo de realizado o tratamento, já nos alertou para um prognóstico ruim (Figura 17).

Figura 17 - Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 5

Figura 17: Fotografias referentes à cirurgia do animal 5. Em A o animal posicionado em decúbito ventral para início da cirurgia, em B, afastamento da camada muscular para acesso a medula espinhal, em C aplicação das células no foco da lesão e em D ao final do procedimento cirúrgico o animal já com os pontos

Animal 6

Após a anestesia, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo onde após seccionamento da musculatura adjacente e retirada da lâmina óssea, foi possível observar o aspecto túrgido e homogêneo da medula espinhal na zona peri lesão, no entanto, é possível observar com clareza o local lesionado que apresenta um aspecto de tecido necrosado (Figura 18).

Figura 18 - Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 6

Figura 18: Fotografias referentes a cirurgia do animal 6: Em A visualizamos a medula espinhal e o foco da lesão, em B e C a aplicação das células-tronco em diferentes pontos da medula espinhal e em D ao final do procedimento cirúrgico, o animal já com os pontos

Animal 7

Após a anestesia, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo onde após seccionamento da musculatura adjacente e retirada da lâmina óssea, foi possível ter acesso ao material que estava fazendo a compressão da medula espinhal, após a retirada desse material realizamos a aplicação das células-tronco (Figura 19).

Figura 19 - Fotografias referentes ao procedimento cirúrgico realizado no animal 7

Figura 19: Fotografias referentes a cirurgia do animal 7: Em A, afastamento da musculatura para acesso a medula espinhal, em B, visualização da medula espinhal, em C retirada do material que estava comprimindo a medula espinhal e em D aplicação das células-tronco na lesão

6.5 Ressonância nuclear magnética pós-operatória:

Com a realização da ressonância nuclear magnética pós-operatória (Figuras 20 a 24), buscou-se observar alguma imagem que indicasse uma alteração no aspecto da medula espinhal, após a realização da terapia celular. Foram feitas as imagens dos animais 1,2,4,5 e 6. O animal 3 veio a óbito antes da realização do exame. O animal 7 teve uma mudança de cidade, o que inviabilizou o exame em tempo hábil para compor os resultados deste trabalho; no entanto após contato com a proprietária, a mesma garantiu que virá a São Paulo em dezembro para podermos finalizar o experimento.

Como já havia sido feita uma primeira ressonância destes animais, este exame foi realizado pela segunda vez em menos tempo, levando em média 1:00h por animal.

Uma comparação entre os exames de ressonância nuclear magnética pré e pós-operatórias, pode ser encontrado no quadro 2.

Animal 1

Figura 20 – Imagens do exame de ressonância nuclear magnética pós-operatória do animal 1

Figura 20: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: provável atrofia muscular toracolumbar, com presença de siringomielia entre T12-L1 e em L3, sendo severa na altura de T13-L1, prévia intervenção cirúrgica a direita em T13-L1, desidratação discal multifocal na coluna toracolumbar

Animal 2

Figura 21 - do exame de ressonância nuclear magnética pós-operatória do animal 2

Figura 21: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: Hiperintensidade homogênea mantida entre T9-L2 (com possível avanço cranial dessa hiperintensidade medular se comparada ao estudo anterior), mielopatia extradural compressiva, de leve a moderada entre T12-T13, prévia intervenção cirúrgica entre T11-T13, com atrofia muscular secundária, desidratação discal multifocal em coluna toracolumbar.

Animal 4

Figura 22 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pós-operatória do animal 4

Figura 22: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: progressão da atrofia medular toracolumbar, fratura antiga inalterada entre T10-T11 que segue inalterada, provável pequena sirringomielia cranial e caudal entre T10-T11 (de forma alternativa, a possibilidade deste sinal representar gliose não pode ser descartada), degeneração discal em T10-T11, provavelmente secundária à fratura de T10-T11.

Animal 5

Figura 23 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 5

Figura 23: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: Hipersinal medular focal associado a siringohidromielia na altura da epífise cranial de L2 até L3-4 (dado a cronicidade da lesão clínica, o hipersinal medular provavelmente representa gliose/mielomácia focal); provável atrofia medular toracolumbar, mielopatia extradural compressiva ventromediana em L2-3 de grau leve, prévia intervenção cirúrgica a direita em L1-2 e L3-4; discretas protusões discais em T13-L1 e L1-2, sem compressão medular significativa; atrofia muscular paravertebral lombar direita e esquerda de formas acentuada e leve respectivamente, degeneração/desidratação discal multifocal na coluna toracolumbar

Animal 6

Figura 24 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 6

Figura 24: As imagens da ressonância nuclear magnética no segmento toracolumbar sugerem as seguintes impressões: progressão da atrofia medular entre T11-L3, hipersinal medular na altura de T12, podendo representar área de mielomácia ou gliose, siringohidromielia em T11 e T13, mielopatia extradural compressiva em T12-T13, provável intervenção cirúrgica em T11-T12, desidratação discal multifocal e espondiloses leves em coluna torácica caudal

Quadro 2- Comparação dos exames de ressonância nuclear magnética pré e pós-operatórios dos animais selecionados para o estudo

Animal	Ressonância nuclear magnética pré-operatória	Ressonância nuclear magnética pós-operatória
1	Sinal multifocal reduzido em diferentes graus ao longo de toda a coluna torácica, mielopatia extradural compressiva ventrolateral direita em T13-L1, com presença deiringohidromielia secundária, e em T9-T10	Provável atrofia medular toracolombar comiringohidromielia de T12 a l1 e L3, mais severa em T13-L1 Intervenção cirúrgica a direita de T13-l1 Protusão discal em T12-13 e T13-L1, sem compressão medular significativa Degeneração/ desidratação discal multifocal na coluna toracolombar
2	Hiperintensidade homogênea de medula espinhal entre T13 e L3 Siringohidromielia concomitante, desidratação discal multifocal	Hiperintensidade homogênea de medula espinhal entre T9 e L2 Siringohidromielia concomitante, desidratação discal multifocal Mielopatia extradural compressiva leve a moderada lateral direita em T12-T13 Intervenção cirúrgica em T11-12 e T12-13, com atrofia paravertebral secundária.
3	Hipertensidade homogênea de medula espinhal de T11 a T13, com leve hidromelia caudal. Desidratação discal multifocal Provável compressão da raiz nervosa a esquerda em L7-S1	Óbito
4	Fratura antiga de T10, com má união vertebral e subluxação dorsal em T10-11, Degeneração discal em T10-11	Fratura antiga de T10, com má união vertebral e subluxação dorsal em T10-11 Degeneração discal em T10-11 e progressão da atrofia medular toracolombar Pequenairingohidromielia cranial e caudal a T10-11
5	Hipersinal medular focal associado airingohidromielia na altura da epífise cranial de L1. Cronicidade da lesão clínica/ gliose. Intervenção cirúrgica a direita em L1-2 e L3-4 Protusões discais discretas em T13-L1, L1-2 e L2-3, sem compressão medular significativa com Atrofia muscular paravertebral lombar direita Degeneração/ desidratação discal multifocal na coluna toracolombar	Hipersinal medular focal associado airingohidromielia na altura da epífise cranial de L1. Cronicidade da lesão clínica/ gliose. Intervenção cirúrgica a direita em L1-2 e L3-4 Protusões discais discretas em T13-L1, L1-2 e L2-3, sem compressão medular significativa Atrofia muscular paravertebral lombar direita (acentuada) e esquerda (leve) Degeneração/ desidratação discal multifocal na coluna toracolombar Provável atrofia medular toracolombar e mielopatia extradural compressiva ventromediana em L2-3 de grau leve
6	Mielopatia extradural compressiva ventrolateral esquerda severa em T11-12 Protusão discal leve em L3-4, sem compressão medular importante Desidratação/degeneração discal multifocal e espondiloses leves multifocais em coluna torácica caudal e lombar	Provável pinçamento das raízes nervosas dos forâmens intervertebrais esquerdos de T10-11 e T11-12 Protusão discal leve em T13-L1 e L3-4, com compressão medular leve Desidratação/degeneração discal multifocal e espondiloses leves multifocais em coluna torácica caudal e lombar Siringohidromegalia leve em T11 e L1, provável atrofia medular de T11 a L1 Provável osteoartrose facetaria esquerda em T11-12 T13-L1, com estenose focal do canal vertebral
7	Siringohidromelia de T12 a L1, Intervenção cirúrgica na porção esquerda da lamina vertebral de T13-L1 Desidratação/ degeneração de todos os discos intervertebrais presentes no exame	Exame agendado em dezembro de 2012 (motivo – mudança de cidade)

6.6 Avaliação fisioterapêutica de acordo com a escala de Olby

As avaliações fisioterapêuticas foram realizadas no momento pré-operatório e durante os noventa dias após a realização do procedimento cirúrgico e aplicação das células. Como pode ser observado no quadro 3, os animais 3,4, 6 e 7 apresentaram uma evolução considerada satisfatória após o tratamento. O mesmo não pode ser evidenciado nos animais 1 e 2. Para um melhor entendimento, estas evoluções foram demonstradas no formato de gráfico (Gráfico 1).

O animal 1, apresentava uma paralisia flácida sem contratura articular significativa. No entanto, os achados vistos no momento da cirurgia e as imagens da ressonância magnética justificam a pouca evolução do cão, que apesar de não evoluir significativamente no que diz respeito à movimentação dos membros pélvicos, mostrou uma boa evolução na contratura muscular através de estímulo o que revela uma reativação da via nervosa.

O animal 2 apresentava uma contratura muscular bastante acentuada e isso fez com que houvesse um comprometimento bastante significativo das articulações dos membros pélvicos. Devido a este fato a fisioterapia inicial foi baseada principalmente na recuperação desta musculatura e consequentemente no aumento da amplitude articular

O animal 3 no início do tratamento apresentava pouca contratura muscular. Durante o tratamento na esteira aquática, o paciente evidenciou uma movimentação significativa dos membros pélvicos que evoluiu bastante no decorrer da fisioterapia. Outros pontos importantes foram as tentativas de se levantar, sustentando seu peso corporal observadas durante as sessões. O retorno do abano voluntário da cauda também foi notado, o qual segundo os proprietários não era observado antes do tratamento.

O animal 4 foi o único animal do tratamento que foi acometido por trauma. Antes do tratamento este animal apresentava um quadro de incontinência urinária e não conseguia sustentar o peso do corpo para uma deambulação adequada. Após o tratamento, o paciente conseguiu firmar postura e dar alguns passos antes de cair. Isso indica uma evolução bastante significativa. Outro ponto que merece destaque é a micção espontânea do animal, a qual que segundo a proprietária apenas era feito com o auxílio de compressão manual.

Em relação ao animal 5, o mesmo apresentou uma lesão associada ao trauma medula (luxação de patela bilateral) o que causou uma contratura muscular bastante significativa. Optamos por realizar a terapia celular associada à cirurgia corretiva dos 2 joelhos. No entanto, mesmo após o procedimento cirúrgico, um dos joelhos não ficou estável sendo necessária uma nova intervenção cirúrgica o que comprometeu toda a avaliação do animal e impossibilitou uma análise para pontuação do mesmo perante a Escala de “Olby”.

O animal 6 foi o único animal do experimento a apresentar um comportamento agressivo o que dificultou a obtenção de imagens de deambulação pré-operatórias. As filmagens relacionadas a sensação de dor profunda e reflexo de pânico foram realizadas com o auxílio de focinheira. Nesse caso observamos também uma evolução considerada satisfatória no quesito marcha, além de recuperação do abano voluntário da cauda

O animal 7 foi filmado já com a colocação de um apoio na esteira seca, visando obter uma avaliação mais detalhada. Este animal apresentou durante o tempo de avaliação uma dermatite bacteriana o que impossibilitou que o mesmo realizasse os exercícios de reabilitação na esteira aquática, sendo assim as filmagens foram realizadas em esteira seca. Outro agravante deste animal foi o fato da proprietária do mesmo ter se mudado para outra cidade. Mesmo com essas limitações, observamos uma evolução considerável no que diz respeito a marcha desse animal, além do retorno do movimento voluntário da cauda que não se observava antes da cirurgia

Todos os nossos animais foram filmados durante as sessões de fisioterapia com o objetivo de acompanhar a evolução dos mesmos. Esses vídeos foram editados e enviados por arquivos separados para os membros avaliadores deste trabalho.

Quadro 3 - Dados referentes às avaliações fisioterapêuticas dos animais, de acordo com a escala de Olby, antes e após a realização do procedimento cirúrgico e injeção de células tronco – São Paulo, Sp - 2012

Animal	Momento	Escala de Olby	
1	Pré – tratamento	0	Ausência de movimento dos membros pélvicos sem sensação de dor profunda
	Pós – tratamento	3	Mínima protração (movimento de uma articulação) do membro pélvico sem deslocamento de peso.
2	Pré – tratamento	0	Ausência de movimento dos membros pélvicos sem sensação de dor profunda.
	Pós – tratamento	3	Mínima protração (movimento de uma articulação) do membro pélvico sem deslocamento de peso.
3	Pré – tratamento	4	Protração dos membros pélvicos sem deslocamento de peso em uma articulação por pelo menos 50% do tempo.
	Pós – tratamento	9	Protração dos membros pélvicos com deslocamento do peso em 100% do tempo com força reduzida dos membros pélvicos. Mais de 90% de erro ao caminhar (por exemplo: Cruzando os membros pélvicos, andar arrastando os pés, permanecer em estação com os dorsos dos pés, tropeçar).
4	Pré – tratamento	6	Protação dos membros pélvicos com deslocamento do peso em menos de 10% do tempo.
	Pós – tratamento	10	Protração dos membros pélvicos com deslocamento do peso em 100% do tempo com força reduzida dos membros pélvicos. Erros em 50 a 100% do tempo.
6	Pré – tratamento	7	Protação dos membros pélvicos com deslocamento do peso de 10 a 50% do tempo
	Pós - tratamento	10	Protação dos membros pélvicos com deslocamento do peso em 100% do tempo com força reduzida dos membros pélvicos. Erros em 50 a 100% do tempo.
7	Pré – tratamento	3	Mínima protração (movimento de uma articulação) do membro pélvico sem deslocamento de peso.
	Pós – tratamento	9	Protração dos membros pélvicos com deslocamento do peso em 100% do tempo com força reduzida dos mm membros pélvicos. Mais de 90% de erro ao caminhar (por exemplo: Cruzando os membros pélvicos, andar mmarrastando os pés, permanecer em estação com os dorsos dos pés, tropeçar).

Gráfico 1 - Evolução dos animais de acordo com a escala de Olby

6.7 Animais não selecionados

Deve-se salientar que diversos proprietários ofereceram seus animais para a pesquisa. Contudo nem todos os animais foram selecionados para o estudo científico. Dentre as principais causas para a exclusão desses animais, destacam-se as patologias associadas (displasia coxofemoral) e o histórico de tumores.

Ademais, houveram não somente animais que vieram a óbito antes dos primeiros exames, bem como animais que avançaram nas etapas propostas mas que foram excluídos após o exame de ressonância magnética. Foi o caso do animal 8, uma fêmea sem raça definida, que após o laudo do exame, mostrou uma fratura com secção completa da medula espinhal (Figura 25) , o que tornava inviável o prosseguimento no projeto

Figura 25 - Imagens correspondentes à ressonância nuclear magnética pré-operatória do animal 8

Figura 25: Imagem de ressonância nuclear magnética do animal 8, mostrando uma ruptura total da medula espinhal com espaçamento de 1,064 cm entre as extremidades, inviabilizando assim a continuidade do tratamento

7 DISCUSSÃO

O número limitado de estudos realizados em lesões medulares crônicas tratadas com terapia celular, aliado a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura que utilizam como modelos roedores murinos, aumentam a relevância do nosso estudo. Em nosso trabalho, optamos pela utilização de cães acometidos por lesão medular crônica natural ou por trauma (atropelamento). Por isso nossa avaliação foi limitada a avaliações clínicas, fisioterápicas e de imagem não sendo possível ter acesso ao material pós tratamento para uma avaliação histológica que nos permitiria analisar mais a fundo os resultados

Embora existam vários mecanismos capazes de provocar uma lesão medular, os mais utilizados são: através da técnica de queda de peso (BEHRMANN et al., 1992; GRUNER, 1992), dispositivos eletromagnéticos (BEHRMANN et al., 1992; STOKES et al., 1992; HIRUMA et al., 1999), ou um clipe de aneurisma modificado (VON EULER et al., 1997). Estes modelos são eficientes no que diz respeito a homogeneidade da lesão, entretanto não representam de forma satisfatória o mecanismo preciso da lesão medular espontânea ou traumática, como é o caso dos animais tratados no nosso experimento.

Ao escolher a espécie canina para este tipo de estudo, levou-se em consideração o fato de que a maioria dos trabalhos envolvendo lesões medulares utilizam roedores, que apresentam diferenças neuroanatômicas e neurofisiológicas em relação ao ser humano. Estas diferenças podem atrapalhar na extrapolação de resultados comparativos (LEE et al., 2008). Por exemplo, em ratos, o trato corticoespinhal é localizado na coluna dorsal, enquanto que o trato corticoespinhal humano dispõe-se ao longo da face lateral da medula (IWANAMI et al., 2005).

Neste contexto, os modelos de lesões medulares em cães e primatas são considerados essenciais para confirmar os resultados experimentais obtidos em ratos (KIRKNESS., et al 2003). Entretanto, para extrapolarmos os resultados obtidos no nosso projeto para a espécie humana devemos ter o cuidado em considerarmos algumas diferenças anatômicas, como por exemplo, a importância dos tratos corticoespinhal e rubroespinhal. Nos humanos uma lesão no trato corticoespinhal, resulta em hemiparesia espástica grave, enquanto que nos cães resulta apenas em anormalidades leves de postura e marcha, perda mais sutil do

posicionamento e alteração na resposta de saltar. Isso se deve ao fato de que nos cães, ao contrário dos humanos, o trato rubroespinal é mais importante para realização da marcha (BARONE, 2004).

Apesar destas diferenças relacionadas à importância dos tratos medulares, o fato da espécie canina ser naturalmente afetada por lesões medulares (extrusão discal, trauma), torna o cão um modelo homólogo e com ampla possibilidade de extrapolação de resultados para a espécie humana. Esse modelo foi escolhido por Ingo et al (2011) e Theda et al (2011) como forma de aprimorar os resultados obtidos por outros pesquisadores em roedores

Em estudo realizado por Dobkin et al. (2006), a aplicação local de células-tronco em humanos portadores de lesões crônicas de medula, causou meningite em cinco dos sete pacientes tratados. Entretanto em nossos resultados, cães com compressão medular crônica receberam injeção local de células tronco oriundas de medula óssea fetal, e até o presente momento não demonstraram nenhum sinal clínico de rejeição. Nas investigações realizadas por Eva Sykova et al. (2006) e Yanish et al. (2011) na espécie humana, esta segurança na aplicação local de células mesenquimais de medula óssea a curto e médio prazo também foram observadas. Isso evidencia que a aplicação local é uma técnica segura, já utilizada e testada com segurança em outras espécies.

Em nosso trabalho, optamos pela aplicação local das células mediante procedimento cirúrgico, pois entendemos que por se tratar de uma lesão crônica, uma aplicação sistêmica não causaria o resultado que esperamos. A decisão também foi apoiada no fato de não existir mais uma inflamação significativa para o recrutamento das células para o local da lesão. Esta técnica se mostrou segura e sem complicações em relação à injeção das células, embora Winslow et al (2003) e Branco et al (2007), citem em seus trabalhos, que este tipo de cirurgia aumenta os riscos de trombose e complicações pulmonares em humanos. Após realizadas as ressonâncias pós-cirúrgica, não foram observadas deformidades oriunda do procedimento cirúrgico, feito também realizado por Deutsch et al. (2003).

A utilização das células tronco, oriundas de medula óssea fetal canina, em 3 pontos distintos da lesão ou seja: cranialmente, no foco, e caudalmente a lesão, teve como objetivo promover uma conexão entre as partes proximais e distais da lesão, isso segundo Yanish et al. (2011), é de fundamental importância para a restauração do tráfego sensorial normal.

Apesar de estudos optarem pela eutanásia dos animais devido a um prognóstico ruim em relação a recuperação Olby et al. (2003), Arias et al. (2007), Rosmari et al. (2011) e

(THEDA et al. 2011), afirmam em seus estudos, que há um alto índice de recuperação de animais com compressões medulares e perda da dor profunda não submetidos ao tratamento cirúrgico. Os autores indicam uma espera de pelo menos 30 dias antes de fazer um prognóstico relacionado ao retorno dos movimentos voluntários. No entanto, todos os nossos pacientes foram acometidos pela compressão medular a no mínimo 60 dias e nenhuma melhora no quadro inicial nos foi relatada por seus proprietários.

Apesar de Lim et al. (2007) afirmarem que o tratamento com células tronco em lesões medulares funciona de maneira mais eficiente quando feito em um curto período de tempo por lesão (7 a 21) dias, nossos resultados demonstram que, dos 7 animais tratados, 3 apresentaram o retorno do movimento voluntário da cauda antes do término da fisioterapia, o que segundo Olby et al. (2003) é o primeiro sinal indicativo da recuperação da função motora.

Durante o processo de reabilitação, todos os cães foram submetidos ao mesmo tipo de exercícios, respeitando é claro os limites individuais de cada paciente, entre as técnicas utilizadas para a recuperação, os exercícios em esteira (seca e aquática). Estas ferramentas também foram utilizadas de forma satisfatória por Nishida et al. (2011) que afirmaram que essa técnica é bastante “agressiva” para reabilitação e eficiente para esse tipo de paciente.

Em nosso estudo, a utilização de filmagens periódicas para um melhor acompanhamento de possíveis melhoras nos animais após o período de fisioterapia, demonstrou ser uma maneira bastante eficiente de acompanhar a evolução dos nossos pacientes. A mesma técnica foi utilizado por Lee et al. (2008), em estudos semelhantes com o modelo canino.

Uma característica comum a todos os animais envolvidos em nosso estudo, é a alteração miccional e fecal. Por conta da incontinência urinária observada, os animais são estimulados a urinar através de massagem (compressão), embora Olby et al (2003) considerarem que este tipo alteração nem sempre é percebido como um problema por parte dos proprietários. Para nossa surpresa os proprietários dos cães avaliados veem essas alterações de forma significativa e reclamam bastante do fato dos animais terem que usar fralda diariamente.

Dos sete animais tratados, conseguimos uma resposta considerada satisfatória em 4 (casos 3,4,6 e 7). Nestes animais durante a realização da fisioterapia em esteira aquática, pudemos observar a movimentação de algumas articulações (coxofemoral e

femorotibiopatelar) e a recuperação funcional de alguns grupos musculares mais craniais (mm. quadríceps, sartorio, adutor, grácil, gastrocnêmio e bíceps femoral). A inervação destes grupos musculares têm a sua origem entre L4-L6 (nervo femoral e nervo obturador) e entre L6-S2 (nervo isquiático). Estes nervos localizam-se caudalmente a lesão, portanto uma reativação destes nervos nos leva a sugerir que houve uma ação benéfica das células-tronco a nível dos neurônios motores inferiores, uma vez que antes da aplicação, a movimentação destes grupos musculares não era observada. No caso dos animais 3 e 4, foi ainda observada uma melhora na propriocepção consciente uma vez que os mesmos, em determinados momentos foram capazes de apoiar e suportar o peso do próprio corpo. No caso do animal 3 ainda foi observado a flexão de ambos os membros para que o mesmo urinasse. Infelizmente o animal 3 veio a óbito antes mesmo da realização da filmagem na esteira seca, impossibilitando uma avaliação mais detalhada. O animal 6 apresentou uma evolução considerável, no entanto o mesmo começou a apresentar sinais de dor pós tratamento, sendo encaminhado para realização de exame de imagem. Após realização de raio x, foi diagnosticado um estreitamento entre C3-C4 o que impossibilitou que o mesmo continuasse a realizar a fisioterapia nas esteiras, comprometendo assim a uma continuidade na recuperação. Durante a avaliação do animal 5, foi observada luxação de patela bilateral. Este fato fez com que o mesmo fosse submetido a 2 cirurgias corretivas. No entanto mesmo após essas cirurgias não houve uma melhora na contratura muscular do animal, impossibilitando que o mesmo fosse avaliado de maneira correta. Devido a este fato os fisioterapeutas responsáveis pela pontuação na escala comportamental proposta para avaliar uma possível evolução não tiveram como pontuar a deambulação do mesmo e por isso ele foi excluído desta análise. Entretanto um fato que nos chamou a atenção, foi uma observação por parte da proprietária no que diz respeito a retenção da urina desse animal. Segundo a mesma a retenção urinária deste animal melhorou de forma satisfatória.

Os animais que apresentaram um aspecto melhor tanto de imagem através da ressonância magnética, quanto de aspecto da medula espinhal durante o transcirúrgico, foram aqueles que apresentaram uma melhora mais significativa. Estes dados condizem com os achados de Sykova et al. (2006), que afirmam que em lesões completas e muito extensas, somente a aplicação de células-tronco não é suficiente para a reparação tecidual. Seriam também necessárias alternativas que complementassem as ações das células, e, preenchessem a lacuna causada pela morte tecidual. A utilização de polímeros biocompatíveis que possam promover uma boa integração entre as células-tronco e o tecido lesado surge como alternativa viável para esses casos.

Outro ponto que deve ser levado em consideração no nosso trabalho, é a falta de um grupo controle. Esta ausência se justifica pelo fato de que os proprietários selecionados deixaram bem claro que não entrariam no experimento caso o animal corresse o risco de receber apenas a injeção de um placebo e não das células-tronco. Isto reduziria ainda mais o número de animais no nosso estudo, esse mesmo tipo de exigência foi observado por Nishida et al. (2011) em um estudo bastante semelhante ao nosso.

Embora Sykova et al. (2007) tenham concluído em seus estudos, que o estudo da lesão medular em modelos animais não é representativo para extrapolação para humanos devido principalmente as diferenças na fisiologia da doença, acreditamos que por estarmos utilizando animais com lesões espontâneas ou traumáticas, nosso estudo poderá trazer subsídios para aplicação da terapia celular em lesões medulares crônicas em humanos .

Durante o nosso estudo, optamos por uma única aplicação de células-tronco tendo em vista que a mesma seria realizada através de aplicação local, no entanto Hosftetter et al. (2011) acharam em seus estudos que células-tronco autólogas de medula óssea aplicadas sobre ou no interior da lesão desaparecem após 3 semanas da injeção. Estes achados fizeram com que repensássemos a possibilidade de em estudos futuros, após a aplicação local, repetirmos essa aplicação através de outras vias possibilitando assim uma renovação constante destas células.

8 CONCLUSÕES

- 1- O implante heterólogo de células-tronco de medula óssea fetal canina, mostrou-se segura a curto prazo, não apresentando qualquer tipo de rejeição do ponto de vista clínico
- 2- A realização de 3 meses de fisioterapia para recuperação do paciente é um tempo curto se levarmos em conta a cronicidade da lesão e o comprometimento muscular e articular oriundos da lesão
- 3- O sucesso na recuperação está altamente relacionado ao encontrado nas imagens de ressonância magnética e ao aspecto da medula no transcirúrgico
- 4- Até o presente momento, o procedimento cirúrgico (hemilaminectomia) mostrou-se seguro, não apresentando complicações pós-cirúrgicas
- 5- Embora se observe uma melhora clínica considerável nos nossos pacientes, os achados de imagem da ressonância nuclear magnética, apontam para uma estagnação e em alguns casos até uma progressão da lesão
- 6- Embora o número de animais selecionáveis para esse tipo de estudo não seja grande, a inclusão de animais com outras patologias associadas que comprometam a deambulação normal do animal, compromete muito as avaliações pós-tratamento sendo assim inviável
- 7- Considerando a falta de perspectiva de retorno funcional em lesão medular crônica, a terapia celular surge como uma alternativa viável a ser explorada e desenvolvida para a obtenção de resultados promissores

REFERÊNCIAS

- ARIAS, M. V. B.; NISHIOKA, C. M.; GARCIA, C. O.; REIA, A. Z.; JÚNIOR, D. B.; MARCASSO, R. A. Avaliação dos resultados clínicos após cirurgia descompressiva em cães com doença do disco intervertebral. **Arq. Bras. Med. Vet.**, v. 59, 1445-1450, 2007.
- AZIZI, S. A.; STOKES, D.; PROCKOP, D. J. Survival, migration and engraftment of bone marrow stromal cells into the striatum of the adult rats. **Exp Neurol**, v. 153, n. 2, p. 374-375, 1998.
- BAGLEY, R. S.; HARRINGTON, M. L.; SILVER, G. M.; CAMBRIDGE, A. J.; CONNORS, R. L.; MOORE, M. P. Exogenous spinal trauma: clinical assessment and initial management. **Vet Neurol**, v. 21, n. 12, p. 1138-1143, 1999.
- BALTZER, W. I.; MCMICHAEL, M. A.; HOSGOOD, G. L.; KERWIN, S. C.; LEVINE, J. M.; STEINER, J. M.; RUAUX, C. G. Randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial of N-acetylcysteine in dogs with spinal cord trauma from acute intervertebral disc disease. **Spine**, v. 33, p. 1397-1402, 2008.
- BAPTISTE, D. C.; FEHLINGS, M. G. Update on the treatment of spinal cord injury. **Prog. Brain Res.**, v. 161, p. 217-233, 2007.
- BAREYRE, F. M.; SCHW, M. E. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: Insights from DNA microarrays. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 555-563, 2003.
- BARNABE-HEIDER, F.; FRISEN, J. Stem cells for spinal cord repair. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 1, p. 16-24, 2008.
- BEHRMANN, D. L.; BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M. S.; SHAN, B.R. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. **J. Neurotrauma**, v. 9, p. 197-217, 1992.
- BERGMAN, R.; LANZ, O.; SHELL, L. A review of experimental and clinical treatments for acute spinal cord injury. **Vet Medicine**, v. , n. , p.855-866, 2000a.
- BHANOT, Y.; RAO, S.; GHOSH, D.; BALARAJU, S.; RADHIKA, C. R.; KUMAR, K. V. Autologous mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury. **Br J Neurosurg**, v. 25, n. 4, p. 516-522, 2011.
- BOEKHOFF, T. M. A.; ENSIGER, E. M.; CARLSON, R.; BOCK, P.; BAUMGATNER, W.; ROHN, K.; TIPOLD, A.; STEIN, V. M. Microglial contribution to secondary injury evaluated in a large animal model of human spinal cord trauma. **J. Neurotrauma**, v. 28, p. 1-12, 2011.
- BORGES, R. B.; TOOMBS, J. P.; BREUR, G. J.; WIDMER, W. R.; WATERS, D. An imposed oscillatory electrical field improves the recovery of function in neurologically complete paraplegic dogs. **J. Neurotrauma**, v. 16, p. 639-657, 1999.

BOSSOLASCO, P.; MONTEMURRO, T.; COVA, L.; ZANGROSI, S.; CALZAROSSA, C.; BUIAIOTIS, S.; SOLIGO, D.; BOSARI, S.; SILANI, V.; DELILIER, G. L.; REBULLA, P.; LAZZARI, L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. **Cell Res.**, v. 16, p. 329-336, 2006.

BRANCO F.; CARDENAS D. D; SVIRCEV JN. Spinal cord injury: a comprehensive review. **Phys Med Rehabil Clin N Am.**, v. 18, p. 651–679, 2007.

BRAUND, K. G.; SHORES, A.; BRAWNER, JR. W. R. The etiology, pathology, and pathophysiology of acute spinal cord trauma. **Vet Medicine**, v. 85, p. 684- 691, 1994.

BRAY, J. P.;BURBIDGE, H. M. The canine intervertebral disk: part one:structure and function. **J Am Anim Hosp Assoc.**, v. 34, p. 55-63, 1998.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. **Tissue Eng**, v. 11, p. 1198-1211, 2005.

COLE, T. C.; BURKHARTD, D.; FROST, L.; GHOSH, P. The proteoglycans of the canine intervertebral disk. **Biochim Biophys 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.

COUGHLAN, A. R. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord trauma. **J Small Anim Pract**, Oxford, v. 34, p. 117-122, 1993.

CRIPPS, R. A.; LEE, B. B.; WING, P. A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: Towards a living data repository for injury prevention. **Spinal Cord**, v. 49, p. 493-501, 2011.

CUMMINGS, B. J.; UCHIDA, N.; TAMAKI, S. J.; SALAZAR, D. L.; HOOSHMAND, M.; SUMMERS, R.; GAGE, F. H.; ANDERSON, A. J. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. **Proc Natl Acad Sci. USA**, v. 102, p. 14069–14074, 2005.

DEUTSCH, H; HAID, R. W.; RODTS, G. E.; MUMMANEVI, P.V. Postlaminectomy cervical deformity. **Neurosurg Focus**, v. 15, p. E5, 2003.

DOBKIN, B. H.; CURT, A.; GUEST, J. Cellular transplants in China: observational study from the largest human experiment in chronic spinal cord injury. **Neurorehabil. Neural Repair**, v. 20, p. 5–13, 2006.

FERNÁNDEZ, V. L.; BERNARDINI, M. Neurologia em cães e gatos. São Paulo: Editora MedVet, 2010. 447 p.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, U. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, v. 4, p. 267-274, 1976.

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

HIRUMA, S.; OTSUKA, K.; SATOU, T.; HASHIMOTO, S. Simple and reproducible model of rat spinal cord injury induced by a controlled cortical impact device. **Neurol. Res.**, v. 21, p. 313–323, 1999.

HOFFMAN, J. M.; BOMBARDIER, C. H.; GRAVES, D. E.; KALPAKJIAN, C. Z.; KRAUSE, J. S. A longitudinal study of depression from 1 to 5 years after spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 92, p. 411-418, 2011.

IWANAMI, A.; KANEKO, S.; NAKAMURA, M.; KANEMURA, Y.; MORI, H.; KOBAYASHI, S.; YAMASAKI, M.; MOMOSHIMA, S.; ISHI, 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. **J Neurosci Res**, v. 80, p. 182–190, 2005.

JEFFERY, N. D.; BLAKEMORE, W. F. Spinal cord injury in small animals. 2. Current and future options for therapy. **Vet Rec**, London, v. 145, n. 7, p. 183-190, 1999.

JEFFERY, N. D.; PENDERIS, J.; SMITH, P. M.; FRANKLIN, R. J. Bridging the divide: spinal cord repair by cellular transplantation-from research laboratory to therapeutic application. **J Small Anim Pract**, Oxford, v. 42, p. 428-432, 2001.

JEFFERY, N. D.; LAKATOS, A.; FRANKLIN, R. J. M. Autologous olfactory glial cell transplantation is reliable and safe in naturally occurring canine spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 22, p. 1282–1293, 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.

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 Anat** (Basel), v. 118, p. 238-242, 1984.

KARIMI-ABDOLREZAEE, S.; EFTEKHARPOUR, E.; WANG, J.; MORSHEAD, C. M.; FEHLINGS, M. G. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 26, p. 3377–3389, 2006.

KEIRSTEAD, H. S.; NISTOR, G.; BERNAL, G.; TOTOIU, M.; CLOUTIER, F.; SHARP, K.; STEWARD, O. Embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 25, p. 4694–4705, 2005.

KIRKNESS, E. F.; BAFNA, V.; HALPERN, A. L.; LEVY, S.; REMINGTON, K.; RUSCH, D. B.; DELCHER, A. L.; POP, M.; WANG, W.; FRASER, C. M.; VENTER, J. C. The dog genome: Survey sequencing and comparative analysis. **Science**, v. 301, p. 1898–1903, 2003.

KRAUS, K. H. Medical management of acute spinal cord disease. In: KIRK, R. W. **Current veterinary therapy XIII: small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 186-190.

LAVERTY, P. H.; LESKOVAR, A.; BREUR, G. J.; COATES, J. R.; BERGMAN, R. L.; WIDMER, W. R.; TOOMBS, J. P.; SHAPIRO, S.; BORGES, R. B. A preliminary study of intravenous surfactants in paraplegic dogs: polymer therapy in canine clinical SCI. **J. Neurotrauma**, v. 21, p. 1767–1777, 2004.

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 Neurobiol Exp**, v. 67, n. 1, p. 13-22, 2007.

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

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. **J Vet Sci**, v. 8, n. 3, p. 275-282, 2007

LIU, S.; QU, Y.; STEWART, T. J.; HOWARD, M. J.; CHAKRABORTTY, S.; HOLEKAMP, T. F.; MCDONALD, J. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 6126–6131, 2000.

MACHADO, C. **Eletrotermoterapia prática**. São Paulo: Pancast, 2002.

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.

MCDONALD, J. W.; LIU, X. Z.; QU, Y.; LIU, S.; MICKEY, S. K.; TURETSKY, D.; GOTTLIEB, D. I.; CHOI, D. W. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. **Nat Med.**, v. 5, p. 1410–1412, 1999.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANGW, Z. J.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biol Int.**, v. 30, p. 681–687, 2006.

NISHIDA, H.; NAKAYAMA, M.; TANAKA, H.; KITAMURA, M.; HATOYA, S.; SUGIURA, K.; SUGUKI, Y.; IDE, C.; INATA, T. Evaluation of transplantation of autologous bone marrow stromal cells into the cerebrospinal fluid for treatment of chronic spinal cord injury in dogs. **Am J Vet Res.**, v. 72, p. 1118-1123, 2011.

OHTA, M.; SUZUKI, Y.; NODA, T.; EJIRI, Y.; DEZAWA, M.; KATAOKA, K.; CHOW, H.; ISHIKAWA, N.; MATSUMOTO, N.; IWASHITA, Y.; MIGUTA, E.; KUNO, S.; IDE, C. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. **Exp Neurol**, v. 187, p. 266–278, 2004.

OLBY, N. J.; RISIO, L. D.; MUÑANA, K. R.; WOSAR, M. A.; SKEEN, T. M.; SHARP, N. J. H.; KEENE, B. W. Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. **Am J Vet Res**, v. 62, n. 10, p. 1624-1628, 2001.

- OLBY, N.; LEVINE, J.; HARRIS, T.; MUNANA, K.; SKEEN, T.; SHARP, N. Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 222, p. 762-769, 2003.
- OLBY, N.; JEFERRY, N. Pathogenesis of diseases of the central nervous system. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2003. cap. 77, p. 1132-1147.
- PADILHA FILHO, J. G.; SELMI, A. L. Discopatia cervical no cão. Tratamento cirúrgico através de fenestração ventral. Estudo retrospectivo (1986 – 1997). **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v. 29, n. 1, p. 75-78, 1999.
- PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.
- PLATT, S. R.; ABRAMSON, C. J.; GAROSI, L. S. Administering corticosteroids in neurologic diseases. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, Princeton**, v. 27, n. 3, p. 210-220, 2005.
- PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, p. 71-74, 1997.
- PROFYRIS, C.; CHEEMA, S. S.; ZANG, D.; AZARI, M.F.; BOYLE, K.; PETRATOS, S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiol Dis**, v. 15, p. 415-436, 2004.
- ROBINSON, A. J.; SNYDER, L. **Eletrofisiologia clínica**. Porto Alegre: Artmed., 2001.
- RUCKER, N. C. Management of spinal cord trauma. *Progress in Veterinary Neurology*, Santa Barbara, v.1, n.4, p.397-412, 1990
- RUFF, R. L.; MCKERRACHER, L.; SELZER, M. E. . Repair and neurorehabilitation strategies for spinal cord injury. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1142, p. 1–20, 2008.
- SCOTT, H. W.; MCKEE, W. M. Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease. **J Small Anim Pract**, v.40, n.9, p.417-422, 1999.
- SEIM, H. B. Conditions of the thoracolumbar spine. **Seminars in Veterinary MedicineSurgery (Small Animals)**, v. 4, p. 235-53, 1996.
- SEKHON, L. H.; FEHLINGS, M. G. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. **Spine**, v. 26, p. S2–S12, 2001
- SHARP, N. J. H.; WHEELER, S. J. **Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery**. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005. 379 p.
- SHIHABUDDIN, L. S.; RAY, J.; GAGE, F. H. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. **Exp. Neurol.**, v. 148, p. 577–586, 1997.

SHORES, A. Fractures and luxations of the vertebral column. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v. 22, n. 1, p. 171-180, 1992.

STOKES, B. T.; NOYES, D. H.; BEHRMANN, D. L. An electromechanical spinal injury technique with dynamic sensitivity. **J. Neurotrauma**, v. 9, p. 187-195, 1992.

SYKOVÁ, E.; HOMOLA, A.; MAZANEC, R.; LACHMANN, H.; KONRÁDOVÁ, S. L.; KOBYLKA, P.; PÁDR, R.; NEUWIRTH, J.; KOMRSKA, V.; VÁVRA, V.; STULÍK, J.; BOJAR, M. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. **Cell Transplant.**, v. 15, n. 8-9, p. 675-87, 2006.

TARASENKO, Y. I.; GAO, J.; NIE, L.; JOHNSON, K. M.; GRADY, J. J.; HULSEBOSH, C. E.; MC ADOO, D. J.; WU, P. Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior. **J Neurosci Res.**, v. 85, p. 47-57, 2007.

TATOR, C. H. Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties, and recommendations. **Neurosurgery**, v. 59, p. 957-982, 2006.

THACHER, C. Neuroanatomic and pathophysiologic aspects of intervertebral disc disease in the dog. **Probl Vet Med.**, v. 1, p. 333-337, 1989.

THOMSON, A. N. N.; SKINNER, A.; PIERCY, J. Fisioterapia de tity. São Paulo: Santos, 1994.

TOOMBS, J. P.; BAUER, M. S. Intervertebral disc disease. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 2. ed. Pennsylvania: Saunders Company, 1993.

VON EULER, M.; SEIGER, A.; SUNDSTROM, E. Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. **Exp. Neurol.**, v. 145, p. 502-510, 1997.

WEISS, S.; DUNNE, C.; HEWSON, J.; WOHL, C.; WHEATLEY, M.; PETERSON, A. C.; REYNOLDS, B. R.; MULTIPOTENT CNS. stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 7599-7609, 1996.

WINSLOW, C.; ROZOVSKY, J. Effect of spinal cord injury on the respiratory system. **Am J Phys Med Rehabil.**, v. 82, p. 803-814, 2003.

ANEXO 1 – Modelo de Termo livre e esclarecido entregue aos proprietários dos animais selecionados para o estudo.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO OU RESPONSÁVEL

1. NOME:

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

2. NOME DO ANIMAL E/OU NÚMERO DE REGISTRO (TATUAGEM, MICROCHIP, BRINCO)

.....

ESPÉCIE:..... RAÇA:..... PELAGEM:.....

SEXO:..... DATA DE NASCIMENTO:

(PARA REBANHOS)

IDENTIFICAÇÃO DO LOTE:..... NÚMERO DE ANIMAIS:

DADOS SOBRE A PESQUISA

3. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

.....

PESQUISADOR.....

CARGO/FUNÇÃO:..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

4. Departamento:.....Serviço:

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

6. DURAÇÃO DA PESQUISA :
.....

MODELO DOS QUESITOS NECESSÁRIOS PARA O PREENCHIMENTO DO TCLE.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

- 1 – Desenho do estudo e objetivo(s) “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa.....”; ou “o objetivo deste estudo é.....”;
- 2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados no(s) animal(is), com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros;
- 3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – por exemplo, coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos;
- 4 – Descrição dos desconfortos e riscos ao(s) animal(is) esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;
- 5 – Benefícios para o proprietário ou animal(is) (Por exemplo: Não há benefício direto para o proprietário ou animal... Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que..... Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício...);
- 6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o proprietário pode optar;
- 7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr **(preencher o nome do pesquisador principal)**, que pode ser encontrado no endereço **(institucional)** Telefone(s)
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de tratamento do animal na Instituição;
- 9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas (relativas tanto ao proprietário quanto ao animal) serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum animal ou proprietário;
- 10 – Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa ou após a aprovação da CEUAVET.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo”

Eu discuti com o Dr. **(preencher o nome do pesquisador principal)** sobre a minha decisão em incluir meu(s) animal(is) nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados em meu(s) animal(is), seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Concordo voluntariamente que meu(s) animal(is) participe(m) deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu ou meu(s) animal(is) possa(m) ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do proprietário Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de proprietários analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste proprietário para a participação de seu(s) animal(is) neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /