

THIEGO PEDRO FREITAS ARAÚJO

**Injeção em camundongos de células-tronco mononucleares
de cordão umbilical e placenta humana após 3 e 6 semanas
de lesão de medula espinhal experimental**

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Tarcisio Eloy Pessoa de
Barros Filho

**São Paulo
2023**

THIEGO PEDRO FREITAS ARAÚJO

**Injeção em camundongos de células-tronco mononucleares
de cordão umbilical e placenta humana após 3 e 6 semanas
de lesão de medula espinhal experimental**

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Tarcisio Eloy Pessoa de
Barros Filho

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Araújo, Thiago Pedro Freitas

Injeção em camundongos de células-tronco mononucleares de cordão umbilical e placenta humana após 3 e 6 semanas de lesão de medula espinhal experimental / Thiago Pedro Freitas Araújo. -- São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientador: Tarcisio Eloy Pessoa de Barros Filho.

Descritores: 1.Células-tronco mononucleares
2.Traumatismos da medula espinhal 3.Cordão umbilical
4.Avaliação motora 5.Avaliação histopatológica

USP/FM/DBD-295/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

A **minha mãe Claudete**, pelo seu exemplo, empenho, rigidez e perseverança na minha educação. Sem ela nada seria possível.

A **meu pai Odilar** por ser um exemplo silencioso em suas infindáveis noites de estudo.

Ao **meu irmão Thiago** por servir de exemplo a ser seguido principalmente quando ainda morávamos no mesmo teto.

A **minha tia Carmelita** e **meu tio Arthur** por serem segundos pais para mim.

A **minha esposa Marília** que topou continuar essa caminhada iniciada por meus pais e vem me dando amor, amizade e inestimável suporte familiar durante a nossa trajetória.

A **minha filha Helena** que ilumina e alegra tudo que vê.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho** Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade da Pós-Graduação.

Ao **Professor Doutor Alexandre Fogaça Cristante**, Chefe do Grupo de Coluna Cervical e Trauma Raquimedular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela paciência com meu aprendizado e por sua orientação.

Ao **Professor Doutor Raphael Martus Marcon**, Chefe do Grupo de Deformidades e Coluna Lombar do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela sua contribuição com minha formação profissional

Ao mestre médico veterinário **Gustavo Bispo dos Santos**, pelo apoio à realização a este trabalho e seu apoio no laboratório.

Ao estatístico **Rogério Ruscitto do Prado**, pelo profissionalismo na análise dos dados.

À enfermeira **Tania Fernanda Cardoso da Silva** por todo auxílio administrativo incassável e por sua generosidade.

Aos médicos ortopedista **Alex Oliveira de Araújo** e **Fernando Barbosa Sanchez**, por dividirem as dificuldades encontradas e ajudarem a encontrar as soluções para a realização desse trabalho

À **Professora Doutora Maria Helena Alves Nicola**, por seu apoio no uso e manejo das células-tronco.

A **todos os funcionários do IOT-HC-FMUSP** que possibilitaram a realização desta pesquisa.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo da Vinci

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana,
Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão
de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia do trauma raquimedular.....	2
1.2 Fisiopatologia do trauma raquimedular.....	3
1.2.1 Fase aguda.....	3
1.2.2 Fase subaguda.....	4
1.2.3 Fase crônica.....	4
1.3 Terapias adjuvantes.....	5
1.3.1 Metilprednisolona.....	5
1.3.2 Eritropoietina.....	5
1.3.3 Hipotermia.....	6
1.3.4 Anti-inflamatórios não-esteroidais.....	6
1.3.5 Magnésio.....	7
1.3.6 Atorvastatina.....	7
1.3.7 Outras drogas.....	8
1.3.8 Cirurgia.....	8
1.4 Células-tronco.....	9
1.4.1 Células-tronco na lesão tecidual.....	9
1.4.2 Tempo adequado para implantação de células-tronco.....	10
1.5 Camundongos.....	11
2 OBJETIVO.....	12
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1 Células-tronco.....	15
3.1.1 Definição de células-tronco.....	15
3.1.2 Diferenciação das células-tronco.....	15
3.1.3 Tipos de células-tronco usadas em pesquisa.....	17
3.1.4 Células-tronco na regeneração tecidual.....	18
3.1.5 Células-tronco do sangue do cordão umbilical e placenta.....	19
3.1.6 Células-tronco no trauma raquimedular.....	23
3.1.7 Escalas de avaliação.....	24
4 MÉTODOS.....	30
4.1 Ética.....	31
4.2 Dos animais e critérios de inclusão e exclusão.....	32
4.3 Coleta e processamento do sangue do cordão umbilical e placentário.....	33
4.4 Criopreservação e armazenamento das amostras em biorrepositório.....	35
4.5 Processamento do sangue de cordão umbilical e placentário.....	35
4.6 Descongelamento celular.....	37
4.6.1 Materiais, equipamentos e reagentes utilizados:.....	37

4.6.2	Considerações gerais	38
4.6.3	Preparo da solução de descongelamento Plasmin [®] /5% Albumina	40
4.6.4	Descongelamento da unidade.....	40
4.6.5	Diluição da amostra em criotubos	41
4.7	Dos grupos experimentais	42
4.8	Do modelo experimental de lesão medular:.....	43
4.8.1	Protocolo de Anestesia	43
4.8.2	Procedimento cirúrgico	44
4.8.3	Contusão medular.....	45
4.8.4	Pós-Operatório.....	46
4.8.5	Analgesia	46
4.8.6	Antibioticoprofilaxia	46
4.8.7	Protocolo de eutanásia	46
4.8.8	Descarte das carcaças.....	47
4.9	Dos desfechos analisados.....	47
4.9.1	Avaliação funcional	47
4.9.2	Necropsia e avaliação macroscópica	48
4.9.3	Avaliação histológica.....	49
4.10	Análise estatística.....	52
5	RESULTADOS	54
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÃO.....	104
8	ANEXOS	106
9	REFERÊNCIAS	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	- Porcentagem
µL	- microlitro
AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	- Análise de variância
Anticorpos anti-CD11d	- Anticorpos contra marcador de superfície celular
Anti-GFAP	- Anticorpo policlonal <i>anti-gliai fibrillary acidic protein</i>
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASIA	- Associação Americana de Lesão Medular
BMS	- <i>Basso Mouse Scale</i>
C1	- Primeira vértebra cervical
C3	- Terceira vértebra cervical
C8	- Oitava vértebra cervical
CAPESP	- Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisa
CCAC	- <i>Canadian Council on Animal Care</i>
CD34+	- Marcador de superfície celular
CD40	- Marcador de superfície celular
CD80	- Marcador de superfície celular
CD86	- Marcador de superfície celular
CEUA	- Comissão de ética no uso de animais
CMMO	- Células mononucleares de medula óssea
CMN	- Células mononucleares
c-Myc	- Gene do cromossomo 8
CNS	- Conselho Nacional de Saúde
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTE	- Célula-tronco embrionária
CTM	- Célula-tronco mesenquimal
CTPi	- Célula-tronco pluripotente induzida
DMSO	- Dimetilsulfoxido
EPO	- Eritropoietina

FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	- Grama
HBV	- Vírus da Hepatite B
HC-FUMSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCV	- Vírus da Hepatite C
HE	- Hematoxilina-eosina
HIV 1 e 2	- Vírus da imunodeficiência humana 1 e 2
HLA-ABC	- Antígeno leucocitário humano
HLA-DR	- Antígeno leucocitário humano
HTLV I/II	- Vírus linfotrófico de células T humanas I e II
IOT	- Instituto de Ortopedia e Traumatologia
kg	- Quilograma
KLF4	- Krüppel-like fator 4 – gene do cromossomo 9
L	- Litro
LETRAN	- Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos
Macrófagos do tipo M2	- Tipo fenotípico de macrófago
MASCIS	- <i>Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study</i>
MFS	- Motor Function Score
Mg	- Miligramas
mL	- Mililitro
mm	- Milímetro
MO	- Medula óssea
MS	- Ministério da Saúde
NAT	- Teste de ácido nucléico
NMDA	- N-metil D-aspartato
NYU-impactor	- <i>New York University Impactor</i>
°C	- Graus celsius
OCT3/4	- Ligador octâmero de fator de transcrição
PBS	- Tampão fosfato salino
POP	- Procedimento operacional padrão
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
RDC	- Resolução de diretoria colegiada

RhoA	- Ras membro da família homóloga A
SARS-Cov2	- Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SCUP	- Sangue do cordão umbilical e placentário
SCUPh	- Sangue do cordão umbilical e placentário humano
SOX2	- SRY-Box fator de transcrição 2 - gene
T1	- Primeira vértebra torácica
T10	- Décima vértebra torácica
T11	- Décima primeira vértebra torácica
T12	- Décima segunda vértebra torácica
T7	- Sétima vértebra torácica
T8	- Oitava vertebra torácica
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TRM	- Traumatismo raquimedular
USP	- Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Escala BMS.....	26
Figura 2 -	Escala MFS.....	27
Figura 3 -	Camundongo se locomovendo sobre a escada horizontal após lesão medular.....	28
Figura 4 -	Desenho esquemático do kit processamento acoplado a bolsa de coleta	36
Figura 5 -	Camundongo em caixa de indução anestésica	43
Figura 6 -	Laminectomia de T8 com exposição medular no camundongo	44
Figura 7 -	NYU impactor realizando contusão medular em camundongo anestesiado.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das escalas BMS e MFS segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações	56
Tabela 2 - Resultado das comparações múltiplas da escala BMS entre os grupos e momentos de avaliação	59
Tabela 3 - Resultado das comparações múltiplas da escala MFS entre os grupos e momentos de avaliação	62
Tabela 4 - Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações	65
Tabela 5 - Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações	67
Tabela 6 - Resultado das comparações múltiplas dos passos entre os grupos e momentos analisados	70
Tabela 7 - Resultado das comparações múltiplas dos acertos entre os grupos	73
Tabela 8 - Resultado das comparações múltiplas dos escorregões entre os grupos e momentos analisados	75
Tabela 9 - Resultado das comparações múltiplas dos erros entre os grupos e momentos analisados	77
Tabela 10 - Descrição dos parâmetros histológicos segundo grupos e resultado das comparações	80
Tabela 11 - Resultado das comparações múltiplas entre os grupos dos parâmetros histológicos qualitativos que diferiram entre os grupos.....	85
Tabela 12 - Resultado das comparações múltiplas entre os grupos do parâmetro histológicos caudal	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Evolução do gráfico BMS por semana.....	58
Gráfico 2 - Evolução do gráfico MFS por semana.....	61
Gráfico 3 - Percentual de acertos sobre passos tentados.....	79
Gráfico 4 - Análise histológica de necrose/grupo.....	81
Gráfico 5 - Análise histológica de hemorragia/grupo.....	82
Gráfico 6 - Análise histológica de hiperemia/grupo.....	82
Gráfico 7 - Análise histológica de degeneração/grupo.....	83
Gráfico 8 - Análise histológica de infiltrado/grupo.....	83
Gráfico 9 - Análise histológica de brotamento axonal.....	84

RESUMO

Araújo TPF. *Injeção em camundongos de células-tronco mononucleares de cordão umbilical e placenta humana após 3 a 6 semanas de lesão medular espinhal experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O trauma raquimedular é dano catastrófico na vida do doente e até o momento nenhuma medida se mostrou francamente eficaz para o tratamento. O paciente passa da fase aguda para a fase subaguda e por último a fase crônica. E mesmo na última fase, alterações neurofisiológicas continuam a acontecer. A descoberta das células-tronco e o desenvolvimento da manipulação delas abriram uma nova esperança para o lesado medular. As células-tronco retiradas do sangue de cordão umbilical e placenta humana apresentam várias vantagens tanto para o uso em pesquisa quanto clínico. Na literatura, a maioria dos estudos com animais é realizada na fase aguda e subaguda, tendo uma lacuna de conhecimento na fase crônica do trauma raquimedular. Devido ao exposto acima, criou-se interesse nesse estudo para a pesquisa em células-tronco em animais com lesão medular na fase crônica. O objetivo deste estudo foi avaliar, em modelo padronizado, a regeneração nervosa e a recuperação funcional motora de camundongos Balb C com paraplegia cirurgicamente provocada em resposta ao uso de células-tronco, na fase crônica, do sangue do cordão umbilical e placentário de humanos após 3 semanas e 6 semanas do trauma raquimedular. No total, 48 camundongos foram sorteados em 6 grupos de 8 animais. O grupo 1 recebeu as células-tronco 3 semanas após o trauma, o grupo 2, 6 semanas após o trauma. No grupo 3 foi injetada solução fisiológica no sítio da lesão 3 semanas após o trauma e no grupo 4, 6 semanas após o trauma. O grupo 5 foi submetido apenas a lesão medular e o grupo 6 a laminectomia sem lesão medular. As escalas utilizadas para a

avaliação motora foram BMS, MFS e escada horizontal por 12 semanas. Os grupos de intervenção apresentaram melhora motora nas escalas analisadas, principalmente na BMS e na MFS, em relação aos controles, com significância estatística. Na análise histopatológica os grupos intervenção apresentaram menor grau de lesão em relação aos grupos controle com significância estatística. Em relação ao brotamento axonal, os grupos intervenção apresentaram aumento do brotamento axonal em relação aos controles, sendo que na porção caudal, teve significância estatística. Conclui-se que o uso de células-tronco em camundongos, na fase crônica em 3 e 6 semanas do trauma raquimedular, traz benefícios funcionais e histopatológicos para os mesmos.

Descritores: Células-tronco mononucleares; Traumatismos da medula espinal; Cordão umbilical; Avaliação motora; Avaliação histopatológica.

ABSTRACT

Araujo TPF. *Injection of mononuclear stem cells from human umbilical cord and placenta into mice after 3 to 6 weeks of experimental spinal cord injury* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Spinal cord trauma is a catastrophic event to the patient's life and so far no measure has been shown to be frankly effective for the treatment. The patient passes from acute phase to subacute phase and finally to chronic phase. And even in the last phase, neurophysiological changes continue to occur. The discovery of stem cells and the development of their manipulation opened up new hope for the spinal cord injured person. Stem cells taken from human umbilical cord and placental blood have several advantages for both research and clinical use. In the literature, most studies with animals are carried out in the acute and sub-acute phases, with a lack of knowledge in the chronic phase of spinal cord injury. Due to the above, interest was created in this study for research on stem cells in animals with spinal cord injury. The aim of this study was to evaluate, in a standardized model, nerve regeneration and motor functional recovery in Balb C mice with surgically provoked paraplegia in response to the use of stem cells, in chronic phase, from human umbilical cord and placental blood after 3 weeks and 6 weeks of spinal cord trauma. In total, 48 mice were randomly assigned to 6 groups of 8 animals. Group 1 received stem cells 3 weeks after the trauma, group 2, six weeks after the trauma. In group 3, saline solution was injected at the injury site 3 weeks after the trauma and in group 4, six weeks after the trauma. Group 5 was submitted to spinal cord injury only and group 6 to laminectomy without spinal cord injury. The scales used for motor assessment were BMS, MFS and horizontal ladder 12 weeks. The intervention groups showed motor improvement in the analyzed scales, mainly in the BMS and MFS, in relation

to the controls, with statistical significance. In the histopathological analysis, the intervention groups showed a lower degree of injury compared to the control groups, with statistical significance. Regarding axonal sprouting, the intervention groups showed an increase in axonal sprouting in relation to the controls, and in the caudal portion, with statistical significance. It is concluded that the use of stem cells in mice in the chronic phase at 3 and 6 weeks of spinal cord trauma, brings functional and histopathological benefits for them.

Descriptors: Mononuclear stem cells; Spinal cord injury; Umbilical cord; Motor assessment; Histopathological assessment.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do trauma raquimedular

A lesão medular é um dos grandes desafios da medicina. Constitui um dano catastrófico para os pacientes acometidos e nenhuma medida até o presente momento demonstrou-se francamente eficaz para o tratamento, que permanece um desafio^{1,2}.

O trauma raquimedular (TRM) tem a prevalência de um milhão e trezentas mil pessoas no mundo. A sua incidência no mundo é de 180.000 novos acidentados por ano³. Já nos EUA, a sua incidência, varia de 42,4 a 51,4, por milhão de habitantes ao ano, com prevalência entre 220.000 e 285.000 casos⁴. O custo social com esses pacientes é elevado, o tratamento é dispendioso e a produtividade desses pacientes após a lesão é baixa⁵. As despesas com internação inicial aproximam-se de U\$282.245,00, enquanto as modificações da casa (U\$21.000,00), do carro (de U\$1.000 a 65.000), cuidados diários (U\$21.000,00/ano) e trabalhistas (U\$57.000,00/ano) completam o montante de gastos permanentes⁶.

1.2 Fisiopatologia do trauma raquimedular

As alterações decorrentes do TRM são divididas em agudas, subagudas e crônicas. A lesão aguda leva a lesão secundária, ampliando a lesão neurológica. E por último a fase crônica leva a progressão da disfunção neurológica, tanto anterógrada, quanto retrógrada, podendo atingir regiões cerebrais. Entender as fases, sua bioquímica e seus eventos celulares, é de suma importância, pois fornece informação para a aplicação de terapias que podem diminuir a progressão da doença e melhorar o processo de regeneração neurológica⁷.

1.2.1 Fase aguda

A primeira, conhecida também como lesão primária, ocorre imediatamente após o impacto traumático, quando ocorre a contusão, compressão e/ou laceração da medula espinhal, onde o dano tecidual leva a morte celular local, incluindo neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais, além do edema e isquemia. As alterações teciduais permanecem evoluindo, onde a ativação da cascata complementar ocasiona maciça migração de neutrófilos, levando à peroxidação lipídica e à formação de radicais livres, contribuindo para o dano neural. Aumenta-se a concentração intracelular de cálcio e sódio e extracelular de potássio, determinando importante desequilíbrio físico-químico⁸⁻¹⁰.

1.2.2 Fase subaguda

A fase subaguda é marcada pela continuidade de morte celular, estimulada pela invasão de monócitos, macrófagos e linfócitos-T, e pela formação de tecido cicatricial pelos fibroblastos. A desmielinização distal acentua a morte dos oligodendrócitos^{8,9,11}. Em roedores essa fase dura até as 2 semanas e em humanos de 6 meses a um ano. Enquanto na fase aguda o ambiente tecidual é inóspito para o recebimento de transplante celular⁷, a fase subaguda apresenta um ambiente mais amigável para tal¹².

1.2.3 Fase crônica

Na fase crônica, a maioria dos processos iniciados na fase subaguda, continuam evoluindo, inclusive atrofia medular. Morte celular por apoptose continua a ocorrer no sítio da lesão e distante do mesmo. A desmielinização devido a morte dos oligodendrócitos, continua ocorrendo. A cicatriz permanece e se aproxima do sítio da lesão. Há a formação de cistos líquidos devido a perda tecidual⁸.

1.3 Terapias adjuvantes

1.3.1 Metilprednisolona

A procura por tratamentos que melhorem o prognóstico da lesão medular se dá constantemente nos laboratórios ao redor do mundo. O medicamento mais conhecido no meio médico atualmente é a metilprednisolona que é aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pelas agências europeias de medicina, que é usada em altas doses nas primeiras 48 horas do trauma. Ela inibe a peroxidação lipídica, diminuindo os radicais livres circulantes, além de limitar a resposta inflamatória, preservando a barreira hematoencefálica, mantendo o fluxo sanguíneo medular. Contudo, devido aos efeitos colaterais, aumenta o risco de infecções, sangramento gastrointestinal fazendo o seu uso controverso na atualidade¹³.

1.3.2 Eritropoietina

Além dos corticoides, outras medidas farmacológicas e não farmacológicas têm sido testadas. Há estudos controversos sobre o uso da eritropoietina (EPO), com estudos iniciais mostrando melhora motora e histológica com aplicação de EPO intravenosa logo após a lesão, ou 30 minutos ou 60 minutos da lesão, com doses de 1000UI/kg e 5000UI/kg. Os melhores resultados foram mostrados com menores doses, aplicado 60 minutos após a lesão. Contudo, estudos mais recentes, que tentaram replicar os resultados, não mostraram benefício¹⁴.

1.3.3 Hipotermia

Foi também estudado a hipotermia como meio de proteção e melhora dos pacientes com lesão medular. A técnica ganhou projeção após o jogador Kevin Everett da *National Football League* sofrer uma lesão medular cervical e foi tratado imediatamente com hipotermia. Os estudos, realizados em animais, mostram diversos protocolos, variando a temperatura de 30 °C a 34 °C e tempo de hipotermia de 20 minutos a 4 horas. Alguns estudos mostraram melhora histológica e outros melhora motora¹⁴. Há coortes em humanos publicadas mostrando melhora do escore da *American Spinal Injury Association Impairment Scale* (ASIA). Há um estudo clínico duplo cego randomizado iniciado em 2017 - NCT02991690 – acontecendo, tentando responder melhor a eficácia da hipotermia no TRM¹⁵.

1.3.4 Anti-inflamatórios não-esteroidais

Uma droga muito difundida na prática diária dos ortopedistas, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), também foram estudados. Os estudos iniciais foram realizados com indometacina, mostrando principalmente melhora histológica. O ibuprofeno, além da atividade anti-inflamatória, tem a capacidade de reduzir a ativação da proteína RhoA (Ras membro da família homóloga A), aumentando a capacidade de brotamento axonal. Alguns estudos demonstram tanto a melhora histológica quanto motora. Porém a dose utilizada em animais que seria equivalente em humanos, vai bem acima da dose máxima recomendada¹⁴.

1.3.5 Magnésio

O magnésio também está sendo estudado para esse uso. O racional por trás das pesquisas, se deve por ele ser um antagonista fisiológico dos receptores N-metil D-aspartato (NMDA), e por isso tem potencial neuroprotetivo. É estudado principalmente em acidentes vasculares encefálicos e traumas cranioencefálicos. Os estudos que mostram melhor resultado de melhora motora são com a dose de 600 mg/kg, contudo tal dose é tóxica para o ser humano¹⁴.

1.3.6 Atorvastatina

Outra droga, com amplo uso na cardiologia, vem sendo estudada, a atorvastatina. Ela tem mostrado diminuição na expressão de citocinas inflamatórias, aumentar a preservação tecidual e diminuir a apoptose. A droga tem mostrado bons resultados em estudos organizados por diferentes laboratórios, dando robustez aos achados¹⁴. Um ensaio clínico realizado no Irã não mostrou melhora motora nos pacientes após 6 meses¹⁶.

1.3.7 Outras drogas

O riluzole, polietilenoglicol, plioglitazona, estrogênio, progesterona, anticorpos anti-CD11d, minociclina são exemplos de outras drogas estudadas para o tratamento do TRM. Os trabalhos publicados mostram resultados conflitantes tanto quanto a melhora histológica quanto a melhora motora¹⁴. Levando em conta que até o momento não há terapia definitiva, que os resultados das outras drogas são conflitantes, mostra a importância de se pesquisar novas terapias, e dentro delas, as células-tronco são uma tentativa promissora de melhorar o prognóstico desses doentes.

1.3.8 Cirurgia

Há evidência robusta em animais de melhora neurológica ao se fazer a cirurgia precoce de descompressão e estabilização da coluna após o TRM. Apesar da evidência em animais, pouca evidência de qualidade há nos estudos em humanos. Mais recentemente, Badhiwala *et al.*¹⁷ publicaram um estudo com boa qualidade de dados sobre o tema. Analisaram prospectivamente mais de 1500 pacientes, comparando os resultados dos pacientes com descompressão e estabilização até 24 horas e tratamentos mais tardios. Evidenciou-se ganhos tanto na parte sensitiva quanto motora para os pacientes que foram submetidos ao tratamento mais precocemente.

1.4 Células-tronco

As células-tronco são clones celulares capazes de se autorrenovar e ter diferenciação multilinhagem¹⁸. Por sua capacidade de se diferenciar em qualquer célula, elas são uma grande esperança para o tratamento das doenças degenerativas em geral, principalmente as com lesão neurológica, como o acidente vascular encefálico e o TRM.

1.4.1 Células-tronco na lesão tecidual

As células-tronco agem no sítio da lesão por meio de diferenciação celular para repor as células atingidas pela lesão, como por exemplo, no TRM, ou por meio de efeitos parácrinos que objetivam melhorar a ação e preservação de outras células do tecido lesado¹⁹. Elas secretam uma variedade de substâncias como fatores antiapoptóticos, antifibróticos, angiogênicos, antioxidantes, moléculas para matrix extracelular, citocinas, quimiocinas e fatores do crescimento. Os fatores liberados por células-tronco mesenquimais (CTM), no lesado medular, tem a função de proteger os neurônios promovendo a sua regeneração e diminuindo a apoptose. Estimula também o aumento da angiogênese, o que diminui a perda da bainha de mielina e imunomodula as células de defesa, induzindo macrófagos do tipo M2 e diminuindo a expressão de fatores pró-inflamatórios²⁰. Pode-se modular também o efeito parácrino das células-tronco por meio de engenharia genética, aumentando a sua expressão²⁰. Outra opção é o uso de arcabouços feitos por bioengenharia²¹. Já foi descrito também que o condicionamento das células-tronco em ambiente

com baixo oxigênio (hipóxia), melhoram a enxertia dessas células em ambientes hostis, melhorando o seu trabalho no tecido lesado²².

1.4.2 Tempo adequado para implantação de células-tronco

Como visto anteriormente na fisiopatologia do trauma raquimedular, as alterações celulares e químicas na região da lesão variam importantemente ao longo do tempo do trauma, sendo dividida em fase aguda, subaguda e crônica. Em roedores, considera-se fase aguda para a implantação de células-tronco, do ato da lesão até 6 dias, fase subaguda de 1 a 2 semanas e fase crônica, daí em diante¹². Na literatura, há vários estudos fazendo experimentos em células-tronco em animais na fase aguda e subaguda, e menos literatura sobre o uso de células-tronco na fase crônica²³⁻²⁶. Estudar esse terceiro período da lesão é mais desafiador pois abrange amplo período de tempo, já que uma lesão com 3 semanas e outra com um ano são ambas enquadradas no mesmo grupo. Há estudos com implantação de células-tronco com 28 semanas que apresentaram melhora motora²³ enquanto em outros estudos com implantação com 3 meses²⁵ ou 10 meses²⁶ de lesão, apesar de mostrarem melhora histológica não apresentaram nenhum benefício motor para os animais estudados. Devido a grande amplitude de tempo que define a fase crônica, faz-se importante estudar diferentes períodos dessa fase, para assim compreender qual o limite de tempo da lesão para o uso de células-tronco e poder oferecer, no futuro, no tempo adequado, para a população de lesados medulares crônicos que poderão se beneficiar do tratamento.

1.5 Camundongos

O estudo contínuo da fisiopatologia na lesão do sistema nervoso central trouxe evidência para embasar diferentes estratégias de tratamento e alguns resultados positivos foram demonstrados na melhora da função neurológica em pacientes com lesão medular. Toda pesquisa sobre o conhecimento dos processos fisiopatológicos primários e secundários foi feita por pesquisa experimental com modelos de lesão da medula espinal provocada em laboratórios. Dos diversos modelos estudados, a utilização de gatos, cachorros, macacos e ratos foram amplamente estudados, sendo os modelos com ratos os dos mais utilizados^{27,28}. A padronização da lesão medular permite a reprodutibilidade e a análise dos resultados²⁹.

A utilização de camundongos nos modelos experimentais traz vantagens claras com relação a outros modelos com animais maiores. Camundongos custam menos aos laboratórios por ser de fácil criação, demandam menos cuidados e são de fácil manipulação³⁰.

Com a dificuldade crescente em utilizar animais para experimentação científica em tempos modernos, o modelo com camundongos pode ser a chave para um modelo mais simples, prático e barato, permitindo que a pesquisa sobre um tema tão importante continue.

2 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar a recuperação funcional motora e de regeneração neuronal em camundongos Balb C, entre grupos randomizados, após lesão medular cirurgicamente provocada seguida de injeção de células-tronco mononucleares do sangue de cordão umbilical e placenta humana aplicadas após 3 semanas e 6 semanas de lesão, na fase crônica da recuperação neurológica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Células-tronco

3.1.1 Definição de células-tronco

As células-tronco são definidas como uma célula indiferenciada, não especializadas, que podem se autorrenovar para se replicar assim como podem dar origem a células especializadas sobre condições apropriadas^{18,31}.

3.1.2 Diferenciação das células-tronco

A diferenciação da célula-tronco até a célula madura se inicia na sua diferenciação em células-tronco de oligolinhagens que não são autorrenováveis. Essas dão origem a progênies que são mais restritas no seu potencial de diferenciação e por último, dão origem as células maduras¹⁸.

3.1.2.1 Quanto ao tempo

Dividem-se em dois subconjuntos:

- Longo prazo: capazes de autorrenovações indeterminadas.
- Curto prazo: capazes de autorrenovações em intervalo determinado.

3.1.2.2 Quanto ao potencial

Dividem-se, também, no potencial de diferenciação³²:

- Células-tronco totipotentes, como por exemplo os zigotos e suas primeiras divisões, podem se diferenciar em qualquer tipo celular.
- Células-tronco pluripotentes, que podem se diferenciar nas três linhagens embrionárias, mesoderma, endoderma e ectoderma, gerando células especializadas em tecidos ou órgãos.
- Células-tronco multipotentes, tem a habilidade de se diferenciar em células de famílias intimamente relacionadas, como por exemplo, em células da linhagem hematopoiética que podem se diferenciar em leucócitos, hemácias e plaquetas.
- Células-tronco oligopotentes podem se diferenciar em poucos tipos celulares, como por exemplo células-tronco adultas da linhagem linfóide ou mieloide.
- Células-tronco onipotentes podem se diferenciar apenas do seu mesmo tipo.

3.1.2.3 Quanto à origem

De acordo com a origem das células-tronco, também pode-se dividi-las³¹⁻³³:

- Células-tronco embrionárias (CTE) que são totipotentes, derivados da massa celular interna do blastocisto, que é a fase inicial do embrião antes de se implantar no útero, com quatro a cinco dias de idade.

- Células-tronco adultas que podem ser totipotentes ou multipotentes, encontradas no corpo após o desenvolvimento embrionário.
- Células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi) são células produzidas de células adultas somáticas que são geneticamente reprogramadas com fatores transcritores pluripotentes (OCT3/4, c-Myc, KLF4, SOX2) para o estado de CTE, técnica descrita em 2006 por Takahashi e Yamanaka³⁴.
- Células-tronco residentes nos tecidos que são células encontradas em órgãos e tecidos adultos e que tem a função de reparar e regenerar o tecido em que estão. Essas células se originam durante a ontogênese e ficam em estado quiescente até que atividade e o estímulo local ativam a sua diferenciação, proliferação e migração.

3.1.3 Tipos de células-tronco usadas em pesquisa

As CTE e as CTPi são totipotentes, tem a capacidade de auto renovação ilimitada e como consequências dessas características apresentam risco tumorgênico elevado, além dos problemas éticos envolvidos na obtenção das CTE^{35,36}. A fim de se contornar esses problemas, as CTM apresentam boa resposta, já que apresentam risco muito baixo de tumorgênese e não apresentam problemas éticos na sua obtenção, demonstrando ser boa escolha para uso clínico³⁷.

3.1.4 Células-tronco na regeneração tecidual

As CTM são capazes de produzir fatores tróficos e se diferenciarem em linhagens mesodérmicas e não-mesodérmicas, sendo úteis para a reparo e regeneração tecidual³⁸. Essa linhagem tem sido usada na medicina regenerativa devido a algumas propriedades: facilidade isolamento, expansão por meio de culturas, multipotência e propriedades imunomodulatórias. As origens das células mesenquimais são diversas: pele, folículos capilares, tonsilas palatinas, tecido dentário, fluído amniótico, tecido adiposo, placenta e sangue do cordão umbilical.

O avanço das pesquisas mostrou que as células-tronco adultas podem ser utilizadas para regeneração de tecidos em geral. A terapia celular passou a ser testada para o tratamento de lesões em diferentes órgãos, com base na capacidade regenerativa mostrada no transplante hematopoiético. Um exemplo da eficácia da terapia celular é a regeneração do tecido miocárdico em pacientes com doenças coronarianas isquêmicas, a partir de células mononucleares da medula óssea (CMMO) autólogas injetadas diretamente no tecido lesionado, mostrada por diferentes grupos de pesquisadores^{39,40}.

3.1.5 Células-tronco do sangue do cordão umbilical e placenta

O sistema hematopoético foi o primeiro tecido em que se identificou a capacidade de uma célula multipotente originar células progenitoras pluripotentes das linhagens hematológicas. Estas, por sua vez, originam células precursoras restritas à linhagem a que pertencem e, finalmente, as células específicas do tecido. O transplante da fração de CMMO, contendo células-tronco, começou a ser utilizado há mais de 50 anos para tratamento da aplasia de medula óssea (MO) estabelecida após irradiação. Atualmente, o transplante de células-tronco tem uma vasta gama de indicações em doenças neoplásicas e não neoplásicas, representando uma alternativa terapêutica segura e na maioria das vezes eficaz.

Mais recentemente, o sangue do cordão umbilical e placenta (SCUP) mostrou-se rico em células-tronco, representando uma nova perspectiva terapêutica. O primeiro transplante de células-tronco obtidas a partir de SCUP foi realizado em 1988 na França, em um menino de 5 anos de idade com anemia de Fanconi. Desde então, o uso do SCUP passou a ser largamente empregado, com inúmeras indicações clínicas (neoplásicas ou não) comprovadamente seguras⁴¹. As SCUP apresentam uma série de vantagens em relação aos outros métodos de obtenção destas células (punção de MO e coleta de sangue periférico). Destaca-se por ser um método não invasivo, de fácil obtenção, sem risco para o doador, pois é retirado após o nascimento a partir de material que seria descartado. Já foi demonstrado que o material pode ser armazenado por mais de 23 anos com alta eficiência na recuperação da viabilidade e funcionalidade celular após

descongelamento As células possuem telômeros íntegros, conseqüentemente têm maior perspectiva de vida do que as células-tronco obtidas dos demais tecidos “adultos”⁴².

3.1.5.1 Imunogenicidade

Quando obtidas da linhagem do SCUP, a célula-tronco contém células mesenquimais do estroma, células-tronco somáticas irrestritas, células-tronco de pequenas células tipo embrionárias, progenitores endoteliais, e células-tronco epiteliais⁴³. Ela também apresenta a vantagem de ter fácil estocagem, grande capacidade de expansão *in vitro*, proliferação rápida e baixa imunogenicidade⁴⁴. A pouca resposta imunológica se deve a algumas características peculiares da linhagem como a pouca expressão do HLA-ABC, ausência de expressão do HLA-DR, complexo de histocompatibilidade tipo II e antígenos coestimulatórios como CD40, CD80 e CD86^{37,45}. Apresentam também a capacidade de suprimir a ativação imunológica do hospedeiro por inibir a resposta de células imunológicas, além de não apresentar os antígenos de superfície citados acima.

3.1.5.2 Vantagens do uso clínico

As características ímpares proporcionam o bom uso para bioengenharia e terapia com células-tronco, como por exemplo, o uso alogênico em doenças agudas, como infarto agudo do miocárdio, trauma raquimedular e acidente cerebral hemorrágico, já que a número de células-tronco autólogas disponíveis para coleta no corpo do paciente é baixo e nessas situações não há tempo hábil para cultivar as células-tronco autólogas. Outra vantagem de uso de sangue de cordão umbilical é a sua abundância de sítios doadores vindos de milhões de nascimentos anuais³⁷.

3.1.5.3 Vias de implantação no trauma raquimedular

O uso de CTM derivadas de SCUP demonstrou em ratos melhora da resposta motora. Esse ganho foi devido ao aumento dos axônios do trato corticoespinal, menos micróglia e astrócitos reacionais⁴⁶. A rota de implantação de das CTM podem ser por via intraespinal, intratecal ou intravenosa. A implantação intraespinal se coloca na região da lesão, na via intratecal se espera que por via subaracnóidea as CTM se difundam até o sítio da lesão. Por via intravenosa, se acredita que as células migrariam por via de substâncias quimioatraentes para a medula lesada, e passariam a barreira hematoencefálica devido a fatores inflamatórios e vasodilatadores liberados pela lesão, contudo a maioria das células fica presa no pulmão, chegando apenas uma pequena amostra no sítio lesado⁴⁷.

3.1.5.4 Capacidade de diferenciação

As células do SCUP humano, devido à sua natureza primitiva e capacidade de se diferenciar em células não hematopoiéticas de várias linhagens, representam uma fonte potencialmente útil para base da terapia celular após a lesão da medula espinhal. As células-tronco de SCUP mostraram-se capazes de se diferenciar em células do estroma da MO e dos tecidos ósseo, hepático, cartilaginoso, muscular e conjuntivo⁴⁸. Diferentes grupos comprovaram a capacidade de gerar células do endoderma (como hepatócitos e endotélio), além de células ectodérmicas como neurônios e células da glia. As células-tronco de SCUP já tiveram a sua capacidade demonstrada de se diferenciar em diferentes linhagens celulares, como osso, gordura e neurônios, além de sua durabilidade⁴⁹ e viabilidade *in vivo*⁵⁰. Estas descobertas demonstraram que o SCUP é uma fonte importante de células-tronco, potencialmente útil no tratamento de lesões degenerativas, traumáticas e até de prognóstico reservado.

3.1.5.5 Estudos em animais

Chua *et al.*⁵¹ mostraram que células oriundas do sangue do cordão umbilical, quando infundidas em ratos submetidos à lesão raquimedular, eram capazes de levar a uma melhora, por meio da secreção de vários fatores neurogênicos e neurotróficos de apoio trófico a neurônios capazes de ativar a diferenciação a recuperação tecidual. Por outro lado, Dasari *et al.*⁵² observaram que células humanas do SCUP, transplantadas em ratos com lesão raquimedular, pareciam desempenhar um papel importante na

plasticidade funcional dos neurônios motores lesionados por meio da secreção de neurofinas. Há vasta literatura com estudos de células-tronco de cordão umbilical de humanos usados em camundongos e ratos. Em uma revisão de 2017⁵³, são citados 27 estudos que usam a aplicação dessas células em problemas neurológicos em ratos e camundongos.

3.1.6 Células-tronco no trauma raquimedular

Em trabalho realizado em 2009⁵⁴, pesquisadores implantaram em ratos células-tronco embrionárias neurodiferenciadas de camundongos, na fase subaguda da lesão. Ao final do estudo observou-se melhora histopatológica com diferenciação celular com células do ambiente neuronal, migração celular de 8 mm para a borda da lesão e melhora motora em relação aos controles. Nos anos seguintes diversos estudos foram realizados com os mais variados prazos de infusão de células-tronco, diferentes tipos neuronais, diferentes volumes e diferentes rotas de implantação de células-tronco⁵⁵. Pode-se citar, dentre esses, o estudo de Kao *et al.*⁵⁶, que estudou ratos submetidos a lesão medular e posteriormente implantados por via intravenosa células-tronco mesenquimais CD34+ advindas de cordão umbilical humano. Os resultados foram a melhora motora nos animais dos grupos experimentais com detecção de fator neurotrófico de células gliais (GDNF) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Mais recentemente, um estudo realizado em 2022, Sun *et al.*⁵⁷ estudaram a implantação de células-tronco no sítio da lesão medular em

camundongos, na fase aguda, associado ou não a treino motor em esteira de células-tronco mesenquimais da medula óssea. Nesse estudo foi também avaliado, além da recuperação motora, se a via PI3K/AKT/mTOR estaria funcionando nos grupos de intervenção. Tal via é importante para a recuperação neuronal em mamíferos após a contusão medular. Chegou-se a conclusão que os grupos com implante de células-tronco e exercício conseguiram demonstrar melhora motora além da expressão da via PI3K/AKT/mTOR no sítio lesado.

3.1.7 Escalas de avaliação

A utilização de escalas de avaliação é importante para a realização dos trabalhos científicos, pois elas permitem fazer uma análise e comparação objetivas entre os dados e os trabalhos realizados. Para uma escala ser utilizável ela precisa respeitar três parâmetros que é a sensibilidade, a confiabilidade e a validade⁵⁸. A sensibilidade é a capacidade de detectar diferenças no desempenho comportamental como resultado de diferenças na gravidade das lesões, em outras palavras, lesão medular leve, moderada ou grave⁵⁹. Confiabilidade é o grau de consistência das pontuações de classificação ao longo do tempo, dos avaliadores e dos laboratórios. Alta confiabilidade indica que diferentes avaliadores de diferentes laboratórios podem produzir pontuações semelhantes repetidamente para o mesmo animal⁵⁹. A validade é o grau em que as categorias e atributos da escala realmente capturam diferentes aspectos da recuperação locomotora⁵⁹. Dos muitos tipos de validade, validade de face,

validade preditiva e validade concorrente são os mais relevantes para a pesquisa trauma raquimedular. A validade de face indica quão bem a escala mede os elementos da recuperação locomotora. A validade preditiva é o grau em que os escores preveem a neuropatologia subjacente. A validade concorrente é a medida em que uma nova escala mede a recuperação locomotora em relação às medidas existentes⁵⁹.

3.1.7.1 *Basso Mouse Scale (BMS)* para locomoção

Essa escala foi criada por Basso *et al.*⁵⁸, em 2006, como uma adaptação da escala Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)⁶⁰ para o uso em camundongos. É uma escala de avaliação do desempenho funcional de camundongos que sofreram trauma raquimedular contuso em laboratório. A partir da utilização de diferentes graus de lesão medular, com diferentes linhagens de camundongos e comparação dos resultados com os resultados escala BBB que foi criada para ser usada em ratos, chegou-se a conclusão que a escala tem boa sensibilidade, boa confiabilidade e boa validade, sendo adequada para utilização da escala em estudos de trauma raquimedular em camundongos. A avaliação locomotora da BMS segue conforme Figura 1, variando de 0 (sem movimentação) a 9 (normal).

Camundongo: XX.

Grupo: XX.

Data: / /

BMS Scale	Score	Esquerdo	Direito	Média
Ausência de movimentos	0			
Tornozelo com movimento discreto	1			
Tornozelo com movimentos amplos	2			
Movimento óbvio dos membros posteriores	3			
Pisada dorsal	3			
Apoio pata	3			
Apoio pata plantar com peso	4			
Frequente e consistente passada plantar	5			
Menor que 50% de membro anterior e posterior coordenados e paralelos no contato inicial	5			
Menor que 50% de membro anterior e posterior coordenados com contato inicial e patas paralelas	6			
maior que 50% de membro anterior e posterior coordenados e patas rodadas	6			
maior que 50% de membro anterior e posterior coordenados e paralelos no contato inicial	7			
Patas paralelas e tronco estável	7			
Tronco estável e cauda 50% cima/50% baixo	8			
Moderada instabilidade de tronco	8			
Estabilidade normal e cauda sempre para cima	9			

Figura 1 - Escala BMS [Fonte: Borges *et al.*⁶¹]

3.1.7.2 Hindlimb Motor Function Score (MFS)

Escala criada por Farooque em 2000 que avalia a força e coordenação das patas traseiras por meio da avaliação da movimentação associada a capacidade de suportar carga, além da análise da caminhada em barras, que conforme vão estreitando, vai se ganhando mais pontuação, já que o camundongo apresenta mais coordenação. As barras variam de 2 cm de largura a 0,5 cm de largura. Inicialmente a pontuação ia de 0 a 10, e foi atualizada pelo próprio Farooque em colaboração com Isaksson e Olsson para 0 a 13⁶².

Camundongo: XX.

Grupo: XX.

Data: / /

MFS	Score	Esquerdo	Direito	Média
Ausência de movimentos	0			
Movimentos ocasionais	1			
Óbvio movimento em 1 membro posterior	2			
Óbvio movimento em 2 membros posteriores	3			
Passada de 1 membro posterior	4			
Impulso com 2 membros posteriores	5			
Apoia o peso e não deambula	6			
Deambulação com patas rodadas	7			
Deambulação normal em baixa velocidade	8			
Barra 2 cm	9			
Barra 1,5 cm	10			
Barra 1 cm	11			
Barra 0,7 cm	12			
Barra 0,5 cm	13			

Figura 2 - Escala MFS [Fonte: Borges *et al.*⁶¹]

3.1.7.3 Escada Horizontal

O método de avaliação motora chamado escada horizontal foi criado primariamente para ratos por Bolton *et al.*⁶³. A escala posteriormente foi adaptada por Cummings *et al.*⁶⁴ para ser utilizada em camundongos. O método de avaliação funcional por meio da Escada Horizontal consiste na observação da movimentação do camundongo em um plano horizontal formado por filetes de ferro de 0,4 cm de diâmetro dispostos a uma distância de 1,5 cm. A plataforma tem 100 cm de comprimento, 35 cm de largura e está a 46 cm de sua base. Os animais são previamente treinados a caminhar pela plataforma. Necessariamente devem apoiar-se nos filetes de ferro para não cair. O teste tem por intuito analisar a função proprioceptiva dos animais. Para o treino pré-experimental, os camundongos são estimulados a cruzar a

plataforma para alcançar água com açúcar disposta no lado oposto ao lado em que o camundongo inicia a marcha. O mesmo teste é realizado após a intervenção a qual o trabalho tem como objeto de estudo.

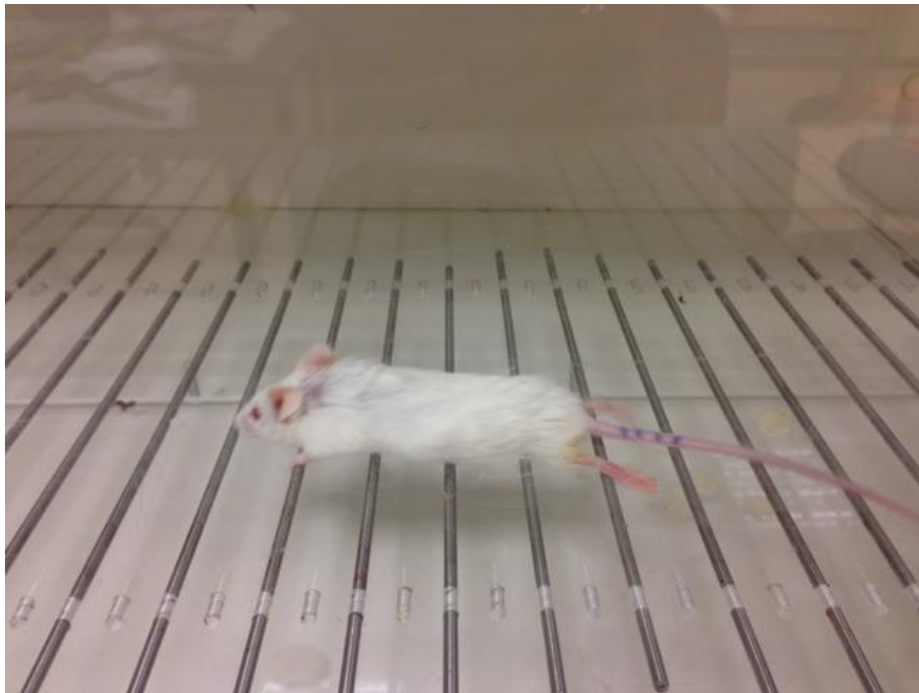


Figura 3 - Camundongo se locomovendo sobre a escada horizontal após lesão medular

Com os dados expostos acima sobre trauma raquimedular, possíveis tratamentos e o desenvolvimento e melhora no uso de células-tronco pode-se concluir que muito a de se fazer quanto à construção do conhecimento do uso de células-tronco nos pacientes lesados medulares. Como a maior parte da literatura nesse tema, quando estudado em humanos, tem intervenções realizadas nas fases intermediárias e crônicas, e em contrapartida, a maior parte da literatura, quando estudado em animais, tem intervenções realizadas nas fases aguda e subaguda, faz-se premente equilibrar essa construção de conhecimento entre as espécies. Além disso, a quantidade de

células-tronco implantada varia na literatura, a via de implante também não é uniforme. Todas essas lacunas justificam a realização desse estudo e mostram o ineditismo dele, já que é o único trabalho realizado em camundongos com implantação de células-tronco mesenquimais humanas de cordão umbilical e placenta com colocação de células na fase crônica, em 3 semanas e 6 semanas do trauma raquimedular.

4 MÉTODOS

4.1 Ética

O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesp) do HC-FMUSP por meio da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) no protocolo 1248/2019 (Anexo A).

Os animais deste estudo foram provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde há rígido controle sanitário, minimizando a chance de prevalência de doenças. A manipulação dos animais foi realizada por técnico experiente, devidamente treinado, pertencente ao Laboratório de Lesão Medular do IOT-FMUSP.

Toda a pesquisa foi realizada de forma ética segundo os padrões estabelecidos pela *Canadian Council on Animal Care* (CCAC) e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Dos animais e critérios de inclusão e exclusão

Foram utilizados 48 camundongos Balb C, alocados entre os grupos aleatoriamente, jovens com idade média entre 10 semanas e 12 semanas, machos, pesando entre 24 g e 33 g com média de 28,25 g e foram divididos em seis grupos de oito animais provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram avaliados quanto às condições gerais (pelagem e estado clínico normais) e à motricidade (motricidade normal), condições estas, para inclusão no estudo.

Foi utilizada uma gaiola (40 cm x 60 cm) para cada três camundongos de uma mesma ninhada. As gaiolas foram mantidas em ambiente climatizado, em boas condições de higiene e os camundongos foram providos de alimentação e hidratação adequadas no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP.

Os camundongos utilizados para esse estudo foram acomodados previamente no laboratório e foram manuseados frequentemente de forma a acostumá-los ao manejo dos experimentadores e estimulá-los a movimentarem-se, facilitando a avaliação dos desfechos de capacidade motora após a lesão.

Foram excluídos os casos de:

- Óbito após lesão medular experimental;
- Anomalias na área lesada da medula observadas macroscopicamente;

- Autofagia ou mutilação entre os animais;
- Movimentação normal na primeira avaliação após lesão
- Paraplegia completa observada após a lesão inicial.

Todas as complicações foram registradas para análise estatística.

4.3 Coleta e processamento do sangue do cordão umbilical e placentário

O SCUP foi coletado de recém-nascidos cujos responsáveis aceitaram participar do estudo, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B), satisfazendo os critérios exigidos pela Resolução CNS nº 466 de 2012, na unidade de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Pelo volume de sangue usado no estudo, foi necessário apenas um doador.

A empresa Cryopraxis® Criobiologia Ltda., Centro de Processamento Celular, foi responsável por todas as etapas de manipulação do material, conforme descrito a seguir, e procedeu de acordo com protocolos técnicos adequados, obedecendo aos critérios de boas práticas nacionais e internacionais.

O SCUP foi coletado por médicos e/ou enfermeiras treinadas pela equipe Cryopraxis® segundo procedimento operacional padrão (POP) validado pela Empresa. O POP consiste em coletar o SCUP no momento do parto imediatamente após ao nascimento do recém-nascido, assim que o cordão umbilical e placentário for clampeado, cortado e o bebê entregue ao pediatra. A coleta foi realizada segundo procedimentos assépticos por

punção do vaso ou artéria do cordão umbilical realizada com bolsa de coleta para sangue de cordão umbilical e placentária antes da dequitação da placenta e após a retirada da mesma e acondicionamento em campo estéril para coleta extra útero.

Após a coleta, o material foi acondicionado adequadamente em frascueira térmica específica e transportado até o laboratório de processamento da Cryopraxis®, com temperatura monitorada/registrada durante todo o trajeto. O transporte foi realizado segundo metodologia validada pela empresa, a qual permite o deslocamento do material de maneira segura, sem alteração da qualidade do produto. A amostra foi mantida nas condições ideais determinadas pela resolução RDC nº 508, ANVISA, de 77 de maio de 2021.

A seguir, o SCUP foi submetido ao processamento celular, realizando-se então teste de viabilidade celular, quantificação e imunofenotipagem. Foram realizados também testes microbiológicos automatizados no material processado para verificar a presença eventual de micro-organismos aeróbios e anaeróbios. A parturiente tem seu sangue periférico colhido para identificação de doenças transmissíveis pelo sangue conforme determinado pelas normas nacionais e internacionais para bancos de sangue de cordão umbilical e placentário (HIV1 e 2, HTLV I/II, Doença de Chagas, Sífilis, Toxoplasmose, Citomegalovírus, Hepatite B e C), além de sorologias específicas a serem relatadas neste estudo como, Dengue, Zika, Chikungunya e Sars-Cov2. O sangue também passa por uma triagem molecular por NAT para HIV, HCV e HBV.

4.4 Criopreservação e armazenamento das amostras em biorrepositório

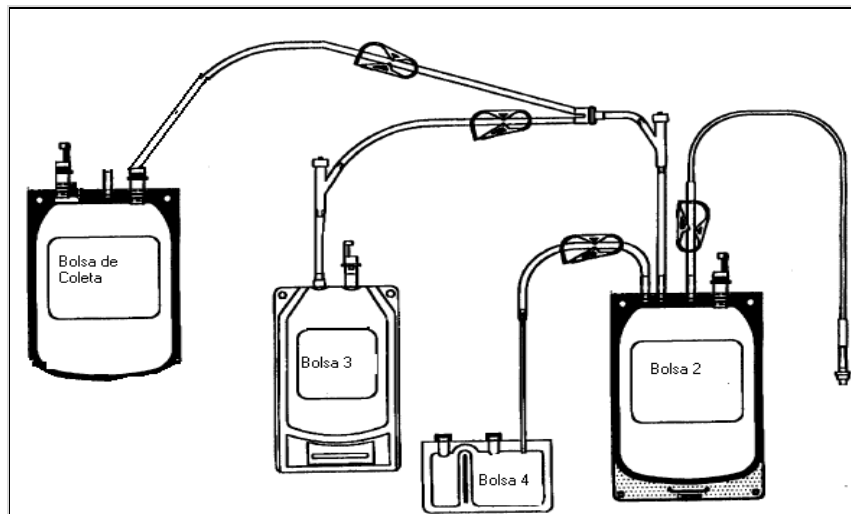
A fração de células nucleadas totais obtidas foi armazenada em criotubos dentro de estojo de metal específico para armazenamento criogênico, na concentração de 1×10^7 cél/mL em solução crioprotetora. As células foram armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C, onde permaneceram até a solicitação para utilização no protocolo pré-clínico.

Em atendimento às diretrizes previstas na Resolução CNS 441/11 e Portaria MS 2201/11, uma amostra de referência foi mantida armazenada pelo período de duração do projeto, para garantia do acesso gratuito às informações associadas ao material biológico utilizado, como por exemplo, às informações genéticas.

4.5 Processamento do sangue de cordão umbilical e placentário

A bolsa de coleta contendo SCUP foi pesada para determinação do volume de sangue de cordão umbilical e placentário colhido, sendo considerado $1\text{g SCUP} = 1\text{mL}$. Em seguida a bolsa permaneceu por 5 minutos em homogeneizador orbital, após o período foi encaminhada para cabine de segurança biológica Classe II A para a retirada de uma alíquota para quantificação inicial do total de células nucleadas e a adição do Hidroxietilamido na proporção de 1:5.

Ainda em cabine de segurança biológica classe IIA, foi realizada a conexão entre o kit de processamento e a bolsa de coleta.



Bolsa 1: coleta; bolsa 2: processamento; bolsa 3: plasma; bolsa 4: congelamento.

Figura 4 - Desenho esquemático do kit processamento acoplado a bolsa de coleta

O conjunto composto pela bolsa de coleta acoplado ao kit de processamento foi colocado em homogeneizador orbital por 20 minutos. Finalizado o período de homogeneização, o conjunto foi centrifugado em centrífuga de grande porte sob refrigeração para a separação do plasma rico em leucócitos.

Após a centrifugação a bolsa de coleta foi posicionada no extrator manual de forma cuidadosa e lenta sem promover a ressuspensão celular. A fração superior contendo o plasma rico em leucócitos foi transferido para a bolsa de transferência (bolsa 2).

O segmento entre a bolsa de coleta e a bolsa de processamento foi selado para a pesagem e determinação do volume de plasma rico em leucócitos pós-sedimentação.

O kit de processamento foi encaminhado para cabine de segurança biológica Classe II A para a retirada uma alíquota para a quantificação final do total de células nucleadas, quantificação das células CD34+ viáveis,

quantificação das células mononucleares, quantificação do percentual de eritroblastos, teste de Hemoglobinas Anormais, viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de trypan.

O kit de processamento foi submetido à uma nova centrifugação com o objetivo de sedimentação dos leucócitos e redução de volume.

4.6 Descongelamento celular

Foi realizado o descongelamento de criotubos de forma a manter a viabilidade celular com menores perdas possíveis, seguindo protocolo Cryopraxis®.

4.6.1 Materiais, equipamentos e reagentes utilizados:

- Agulha de 40x12.
- Albumina humana 20% (200g/L).
- Álcool 70%.
- Banho-maria.
- Cabine de segurança biológica.
- Centrífuga refrigerada.
- Criotubo.
- Dispositivo para transferência de soluções em sistema fechado.
- Estante para tubos.
- Estéril pack estéril.
- Frasqueira térmica ou isopor.

- Gaze estéril.
- Geladeira de reagentes.
- Nitrogênio líquido.
- Pipeta estéril.
- Plasmin (hidroxietilamido 6% 450/0,7).
- Protetor de cone.
- Seringa de 10 mL.
- Seringa de 20 mL.
- Seringa de 5 mL.
- Seringa de 60 mL.
- Swab de álcool 70%.
- Tesoura estéril.
- Tubo cônico com capacidade para 50 mL.

4.6.2 Considerações gerais

Unidades de sangue do cordão umbilical foram criopreservadas em uma solução contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e plasma autólogo. As células-tronco criopreservadas em DMSO têm viabilidade limitada após o descongelamento, resultando no potencial de perda significativa de células disponíveis para transplante. O DMSO foi o crioprotetor intracelular de escolha, porém este apresenta efeitos citotóxicos quando aquecido a 37 °C. Imediatamente após o descongelamento, o DMSO intracelular cria um ambiente hipertônico que leva a mudanças repentinas de fluidos que comprometem a viabilidade celular. Além disso, o DMSO causa efeitos

adversos *in vivo* após a reinfusão, incluindo instabilidade da pressão arterial, febre, calafrios e náusea. A lise dos glóbulos vermelhos leva ao acúmulo de hemoglobina livre que pode ser nefrotóxica quando infundida por via intravenosa.

A diluição das células descongeladas com uma solução hipertônica, imediatamente após o descongelamento, pode amenizar muitos desses problemas. A solução hipertônica de descongelamento continha 5% de albumina humana e 95% de Plasmin[®]. A solução de descongelamento de Plasmin[®]/Albumina ajudou a restaurar a osmolaridade da suspensão de células, promovendo o equilíbrio intracelular coloidal-osmótico. As suspensões celulares puderam então ser lavadas por centrifugação para remover DMSO, hemoglobina livre e outros restos de produtos celulares, permitindo assim que outros procedimentos fossem realizados.

Para maximizar a recuperação de células viáveis, as unidades de sangue do cordão criopreservadas foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37 °C. O descongelamento ocorreu em cerca de 3 minutos. A amostra saiu ainda gelada do banho-maria, minimizando o risco de diminuição da viabilidade celular. O conteúdo celular presente na suspensão foi então, lenta e suavemente, diluído com uma solução hipertônica contendo 95% de Plasmin[®] (hidroxietil amido 450/0,7 6%) e 5% de albumina humana.

4.6.3 Preparo da solução de descongelamento Plasmin[®]/5% Albumina

A solução de descongelamento foi preparada com antecedência mínima de 30 minutos antes do início do processo para que ela estivesse refrigerada antes da utilização.

Ex.:

Plasmin[®]----- 37,5 mL

Albumina 20% ----- 12,5 mL

q.s.p.----- 50 mL

Na cabine de segurança biológica realizou-se a assepsia da porta de punção do Plasmin[®] com um swab de álcool a 70%, e de forma asséptica utilizando seringa de 60 mL e agulha 40x12, recolheu-se o volume de 37,5 mL de Plasmin[®], transferindo-o para um tubo cônico de 50 mL.

Em seguida, foi realizada assepsia da rolha de vedação do frasco de Albumina com auxílio de um swab de álcool 70%, e de forma asséptica, utilizando uma nova seringa de 20 mL e uma nova agulha 40x12, retirou-se 12,5 mL da solução de albumina 20% e adicionou-se ao tubo cônico de 50 mL. Obteve-se então uma solução de descongelamento Plasmin[®]/Albumina 5% que foi mantida refrigerada até a sua utilização.

4.6.4 Descongelamento da unidade

Para iniciar o descongelamento, os criotubos foram mergulhadas no banho-maria a 37 °C até que alcançou uma consistência líquida, porém ainda com a presença de cristais. O processo levou cerca de 3 minutos para ocorrer. Foi realizado o descongelamento de apenas uma unidade de cada vez.

4.6.5 Diluição da amostra em criotubos

A solução de descongelamento foi aliqüotada antes de iniciar o processo devido a necessidade do descongelamento ocorrer de forma ágil. Todo o processo foi realizado de forma asséptica.

Para cada tubo descongelado:

- Foi adicionado 5 mL da solução de plasmina/albumina em um tubo de cônico de 50 mL estéril e a mesma foi reservada.
- Foram preparadas duas seringas de 10 mL, uma com 2 mL de solução de plasmina/albumina e outra com 1 mL de solução e ambas também foram reservadas.

Utilizando a seringa com 1 mL de solução previamente preparada, gotejamos a solução no criotubos. Promoveu-se uma diluição inicial de 1:1 (1 mL de amostra: 1 mL solução de descongelamento).

Em seguida, de forma gentil, foi aspirado todo o conteúdo do criotubo, transferindo lentamente para o tubo cônico contendo a solução de descongelamento.

Com a seringa contendo 2 mL de solução adicionamos o volume no criotubo, promovendo a lavagem das paredes do tubo e recolhendo as células residuais. Repetimos mais uma vez este processo certificando que não foi desperdiçada nenhuma parte do material.

Transferimos todo o conteúdo da seringa onde ocorreu a diluição de forma lenta para o tubo cônico de 50 mL. O tubo foi tampado utilizando manipulação asséptica e misturado o conteúdo por circulação manual lenta.

A diluição final da amostra foi de 1:10.

4.7 Dos grupos experimentais

Foram utilizados 48 animais divididos em seis grupos com oito animais:

Grupo 1: os animais foram submetidos à contusão medular por queda de peso (10 g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS Impactor. Foi aplicado no local da lesão, um volume de $4 \times 10^5/40 \mu\text{L}$ – CMN –SCUPh em dose única, 3 semanas após contusão medular.

Grupo 2: os animais foram submetidos à contusão medular por queda de peso (10 g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS Impactor. Foi aplicado no local da lesão, um volume de $4 \times 10^5/40 \mu\text{L}$ – CMN –SCUPh em dose única, 6 semanas após contusão medular.

Grupo 3: os animais foram submetidos à contusão medular por queda de peso (10 g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS Impactor. Foi aplicado no local da lesão solução fisiológica a 0,9% em dose única, 3 semanas após contusão medular.

Grupo 4: os animais foram submetidos à contusão medular por queda de peso (10 g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS Impactor. Foi aplicado no local da lesão solução fisiológica a 0,9% em dose única, 6 semanas após contusão medular.

Grupo 5: os animais foram submetidos à contusão medular por queda de peso (10 g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS Impactor.

Grupo 6: os animais foram submetidos à via de acesso e laminectomia sem realização de lesão medular.

4.8 Do modelo experimental de lesão medular:

Os procedimentos foram realizados no LETRAM do IOT-HC-FMUSP. Os animais foram mantidos no biotério do IOT-HC-FMUSP.

4.8.1 Protocolo de Anestesia

Os animais foram submetidos à medicação pré-anestésica utilizando cloridrato de tramadol na dose de 0,3 mg/100 gramas associado a meloxicam na dose de 0,02 mg/100 gramas por via subcutânea.

Para o procedimento anestésico, foi utilizado equipamento de anestesia inalatória Bonther, sendo que os animais foram colocados em caixa de indução anestésica inalatória com Isoflurano. Após confirmação do plano anestésico os animais foram colocados em máscara de nebulização com Isoflurano a 2%.



Figura 5 - Camundongo em caixa de indução anestésica

4.8.2 Procedimento cirúrgico

Após confirmação do plano anestésico por aperto na pata traseira, foi realizada tricotomia na região dorsal, antissepsia com clorexidine e incisão longitudinal na topografia de T7 a T11. Após dissecação por planos e exposição da musculatura paravertebral, foi realizada exposição dos componentes posteriores da coluna dorso-lombar. Após, foi realizada a laminectomia de T8 no sentido caudo-cranial para exposição medular.



Figura 6 - Laminectomia de T8 com exposição medular no camundongo

4.8.3 Contusão medular

As lesões foram produzidas obedecendo ao protocolo internacional *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS)*⁶⁵; pelo sistema NYU Impactor^{29,66}. O sítio lesionado foi irrigado com soro fisiológico à temperatura ambiente, seguindo-se à inspeção, cauterização, aproximação dos tecidos e sutura da pele.

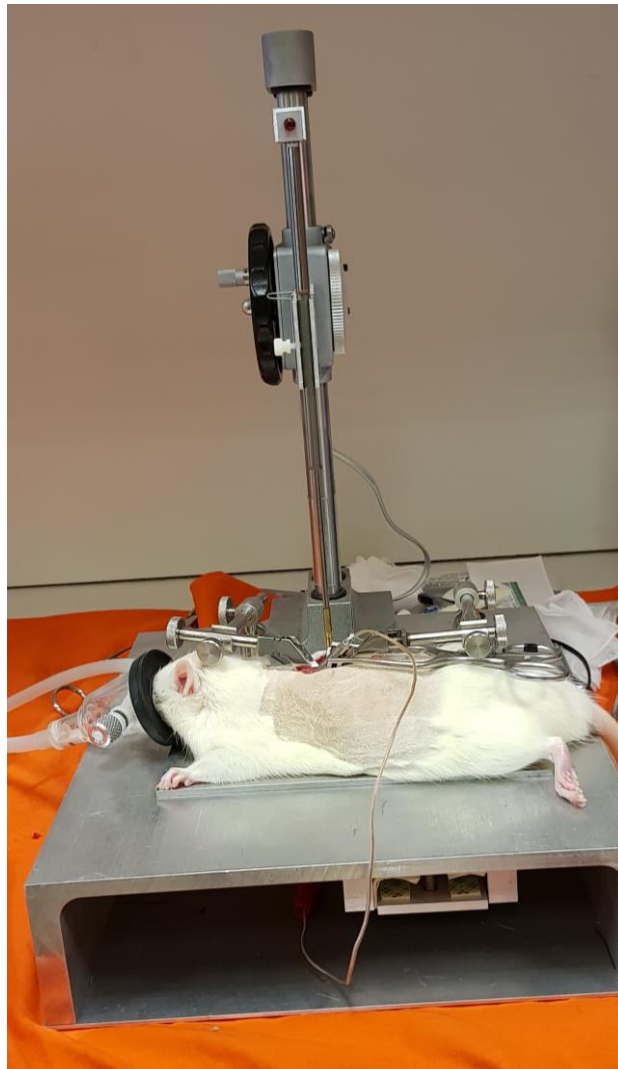


Figura 7 - NYU impactor realizando contusão medular em camundongo anestesiado

4.8.4 Pós-Operatório

Foram mantidos três animais por gaiola medindo (60 cm x 40 cm) sendo fornecido ração e água à vontade. As massagens para esvaziamento vesical foram efetuadas diariamente, assim como avaliação de possíveis complicações, como infecção urinária, pneumonia e úlcera de pressão.

4.8.5 Analgesia

Foi utilizado cloridrato de tramadol na dose de 0,3 mg/100 gramas por via subcutânea a cada 8 horas durante 5 dias.

4.8.6 Antibioticoprofilaxia

Foi realizado protocolo de antibioticoprofilaxia com amoxicilina 15 mg/100 gramas a cada 12 horas durante 7 dias.

4.8.7 Protocolo de eutanásia

A eutanásia foi realizada utilizando o protocolo de anestesia descrito e após a perfusão de solução salina, foi utilizado cloreto de potássio a 20% por via intracardíaca.

4.8.8 Descarte das carcaças

Após o procedimento de ressecção medular, os animais foram acondicionados em sacos plásticos brancos, devidamente identificados e encaminhados para o descarte seguindo apostila de descarte de carcaças da FMUSP.

4.9 Dos desfechos analisados

4.9.1 Avaliação funcional

Foi realizada a avaliação motora dos camundongos durante o período pós lesional, segundo o seguinte cronograma:

- *Basso Mouse Scale* (BMS) no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o, 42^o, 49^o, 56^o, 63^o, 70^o, 77^o e 84^o dia após a lesão⁵⁸.
- Motor Function Score (MFS) no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o, 42^o, 49^o, 56^o, 63^o, 70^o, 77^o e 84^o dia após a lesão⁶⁷.
- Escada Horizontal no 2^o, 7^o, 14^o, 21^o, 28^o, 35^o, 42^o, 49^o, 56^o, 63^o, 70^o, 77^o e 84^o dia após a lesão^{63,64}.

4.9.2 Necropsia e avaliação macroscópica

O exame necroscópico dos camundongos foi realizado de modo a permitir a identificação macroscópica de possíveis alterações em relação ao padrão normal.

Na inspeção inicial, foi observado externamente a presença de possíveis lesões associadas à autofagia ou mutilação. Foi então realizada a retirada da coluna vertebral através de uma via de acesso dorsal extensa. Após a exposição, foi realizada uma incisão entre o segmento de T8 a T12. Com um micro saca-bocados, as estruturas ósseas e partes moles adjacentes à medula foram ressecadas de forma a obter-se a exposição completa da medula espinal.

A medula espinal foi inspecionada macroscopicamente no local da contusão para verificar se havia anomalias estruturais que preencheriam os critérios de exclusão.

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

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

O estudo anatomopatológico consistiu da análise microscópica (óptica) de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE).

Foram realizados cortes histológicos no plano axial no segmento medular com intervalos de dois milímetros, representando toda a área lesada, numa extensão de um centímetro a partir do centro da lesão. Este material foi processado e desidratado em bateria de álcoois, sofrendo processo de diafanização em xilol e, posteriormente, incluído em parafina. Uma vez contido no bloco de parafina, foram feitos cortes histológicos de cinco micras em micrótomo. Estes cortes foram realizados meio centímetro acima e meio centímetro abaixo da área central da lesão. Este material foi então fixado em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina-eosina.

Assim, foram preparadas três lâminas para cada medula, denominadas A, B e C. As lâminas A e C correspondem, respectivamente, às regiões proximal e distal ao sítio de lesão e foram colhidas como forma de controle individual em cada camundongo. Já o fragmento B corresponde ao sítio de lesão propriamente dito, sendo diferente dos fragmentos A e C.

4.9.3 Avaliação histológica

A avaliação das lâminas pelos patologistas foi feita de forma cega, sem que sejam informados a que grupo pertence cada material estudado.

4.9.3.1 Histologia

A medula foi dissecada e posteriormente ressecada a partir do nível intervertebral C3 ao nível T10 e posteriormente aderida linearmente em papel cartão, com suas respectivas identificações topográficas, principalmente onde se observaram os achados macroscópicos de contusão medular a qual foram identificadas como área “B”, sendo também designadas às áreas cefálicas “A” e caudais a lesão “C” e foram submetidos à análise histológica.

Após morte indolor induzida, a medula foi ressecada e submetida às secções transversais nos segmentos cefálico, foco da lesão e caudal. Posteriormente, foi avaliada a matéria branca e cinzenta, tais fatores como volume e morfometria.

Depois de identificadas e acondicionadas, as medulas foram fixadas em formalina a 10%. Cada área previamente identificada como área A, B e C foi seccionada no plano axial de forma macroscópica em intervalos de dois milímetros, partindo da área central da lesão.

Todos os fragmentos foram submetidos aos processos histológicos que compreendem a desidratação em banhos de álcool, diafanização em xilol e a impregnação por parafina líquida. Cada fragmento foi emblocado em parafina e posteriormente identificado com a topografia do respectivo material.

Os blocos parafinados foram encaminhados para o processo de microtomia (cortes histológicos), na qual se obtém cortes com, no máximo, cinco micras de espessura, utilizando-se um micrótomo (Leica RM 2055 – elétrico) e lâminas descartáveis (Erviagas).

As lâminas de vidro utilizadas no processo receberam previamente um banho de silane, para se obter um melhor resultado na aderência dos materiais à superfície da mesma. Todas as lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina.

4.9.3.2 Análise Microscópica

A análise microscópica foi realizada em campo microscópico com objetiva de 100 x com imersão em óleo, lente auxiliar de 1,6 x e fotografadas com câmera digital na resolução de 640 x 470 pixels.

As classificações que foram utilizadas na avaliação microscópica das medulas foram os seguintes itens:

- Necrose.
- Hemorragia.
- Hiperemia.
- Degenerado.
- Infiltrado celular.

Os critérios foram pontuados seguindo o seguinte score:

- 0: ausente.
- 1: discreto.
- 2: moderado.
- 3: intenso.

4.9.3.3 Brotamento axonal

Foram realizadas contagem das fibras mielinizadas nos segmentos craniais, lesão e caudal da medula, utilizando software sigma scan pro.

4.10 Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram descritos segundo grupos e momentos de avaliação com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparados os parâmetros com uso de equações de estimação generalizadas (EEG) com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações autorregressivas de 1ª ordem entre os momentos de avaliação para o BMS e MFS, sendo usado para as análises o menor valor obtido nos dois lados e para o teste da escada horizontal, foi utilizado o número de passos como limitante dos dados (*offset*) da escada horizontal⁶⁸, todas as análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para identificar entre quais grupos ou momentos ocorreram as diferenças⁶⁹, já os parâmetros histológicos foram descritos segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e comparados entre grupos com uso de testes Kruskal-Wallis seguidos de comparações múltiplas de Dunn quando ocorreram as diferenças⁶⁹. Os parâmetros histológicos quantitativos foram descritos segundo grupos com uso de medidas resumo e comparados com uso de análises de variâncias (ANOVA) seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni caso encontradas diferenças.

Para realização das análises foi utilizado o *software* IBM-SPSS *for Windows* versão 22.0 e para tabulação dos dados foi utilizado o *software* Microsoft Excel 2013. Partimos da hipótese nula de equidade, considerando a probabilidade do erro do tipo I de 5% e tipo II de 20%.

5 RESULTADOS

Após a realização dos experimentos nos grupos dos seis grupos de camundongos foram obtidos os resultados abaixo.

Os camundongos ganharam peso ao final do experimento com peso mínimo de 26 g e peso máximo de 39 g, com média de 32,08 g.

A Tabela 1 mostra que o comportamento médio dos grupos ao longo dos momentos avaliados para ambas as escalas foi estatisticamente diferente ($p_{\text{Interação}} < 0,001$).

Tabela 1 - Descrição das escalas BMS e MFS segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações

Variável/Grupo	Momento de avaliação								p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré	2 Dias	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12			
BMS									<0,001	<0,001	<0,001
Lesão + 1 dose 3s											
média ± DP	9 ± 0	0 ± 0	0,63 ± 0,74	1,38 ± 0,52	2,5 ± 0,54	2,75 ± 0,71	3,25 ± 0,46	3,88 ± 0,64			
mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	0 (0; 0)	0,5 (0; 2)	1 (1; 2)	2,5 (2; 3)	3 (2; 4)	3 (3; 4)	4 (3; 5)			
Lesão + 1 dose 6s											
média ± DP	9 ± 0	0 ± 0	0,38 ± 0,52	2,25 ± 0,71	2,25 ± 0,71	2,75 ± 0,46	3 ± 0	3,38 ± 0,52			
mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	2 (1; 3)	2 (1; 3)	3 (2; 3)	3 (3; 3)	3 (3; 4)			
Lesão + Soro fisiológico 3s											
média ± DP	9 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,54	1,38 ± 0,52	1,88 ± 0,35	1,88 ± 0,35	1,5 ± 0,54	1,63 ± 0,52			
mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	0 (0; 0)	0,5 (0; 1)	1 (1; 2)	2 (1; 2)	2 (1; 2)	1,5 (1; 2)	2 (1; 2)			
Lesão + Soro fisiológico 6s											
média ± DP	8,88 ± 0,35	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 0	2 ± 0,54	2 ± 0,54	2,13 ± 0,64	2,63 ± 0,52			
mediana (mín.; máx.)	9 (8; 9)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	2 (2; 2)	2 (1; 3)	2 (1; 3)	2 (1; 3)	3 (2; 3)			
Lesão											
média ± DP	9 ± 0	0 ± 0	0,63 ± 0,52	1,5 ± 0,54	2 ± 0,54	2,13 ± 0,64	1,88 ± 0,64	1,88 ± 0,64			
mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	0 (0; 0)	1 (0; 1)	1,5 (1; 2)	2 (1; 3)	2 (1; 3)	2 (1; 3)	2 (1; 3)			
Sham											
média ± DP	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0			
mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)			

continua

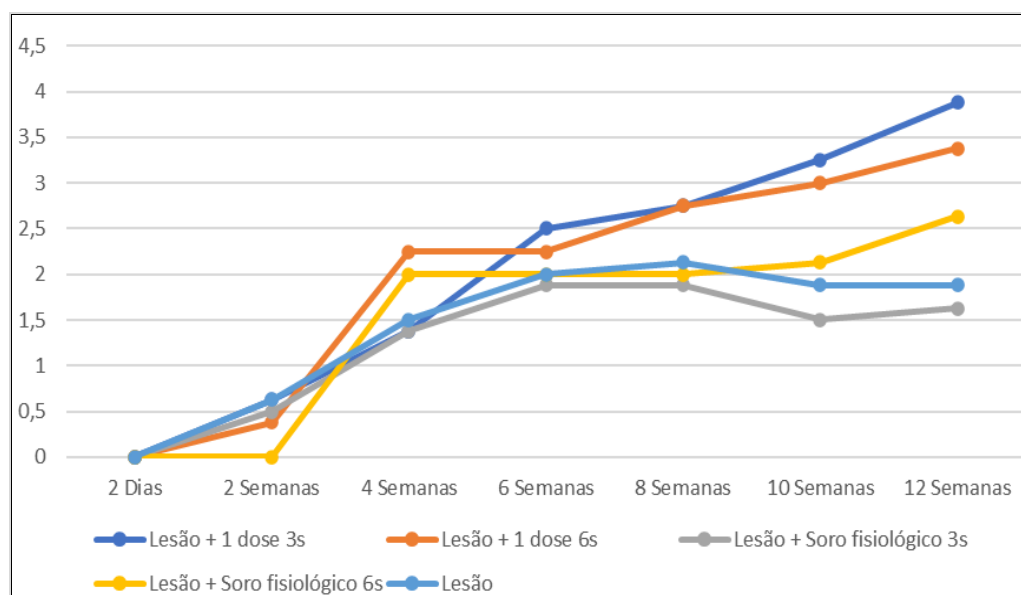
conclusão

Variável/Grupo	Momento de avaliação								p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré	2 Dias	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12			
MFS									<0,001	<0,001	<0,001
Lesão + 1 dose 3s											
média ± DP	11,5 ± 0,93	0 ± 0	0,5 ± 0,54	1,5 ± 0,54	2,75 ± 1,39	3,25 ± 1,39	4 ± 1,31	4,75 ± 0,89			
mediana (mín.; máx.)	11,5 (10; 13)	0 (0; 0)	0,5 (0; 1)	1,5 (1; 2)	3 (1; 4)	4 (1; 5)	4 (1; 5)	4,5 (4; 6)			
Lesão + 1 dose 6s											
média ± DP	11,38 ± 1,19	0 ± 0	0,38 ± 0,52	1,75 ± 0,46	3,25 ± 1,04	3,5 ± 0,93	3,75 ± 0,71	4,13 ± 0,99			
mediana (mín.; máx.)	11 (10; 13)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	2 (1; 2)	4 (2; 4)	4 (2; 4)	4 (2; 4)	4 (2; 5)			
Lesão + Soro fisiológico 3s											
média ± DP	10,88 ± 0,83	0 ± 0	0,5 ± 0,54	1,25 ± 0,46	1,5 ± 0,54	1,75 ± 0,46	1,38 ± 0,52	1,5 ± 0,54			
mediana (mín.; máx.)	11 (10; 12)	0 (0; 0)	0,5 (0; 1)	1 (1; 2)	1,5 (1; 2)	2 (1; 2)	1 (1; 2)	1,5 (1; 2)			
Lesão + Soro fisiológico 6s											
média ± DP	11,63 ± 0,92	0 ± 0	0 ± 0	1,75 ± 0,46	2,38 ± 1,06	2,13 ± 0,84	2,88 ± 1,25	2,75 ± 1,04			
mediana (mín.; máx.)	11 (11; 13)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	2 (1; 2)	2 (1; 4)	2 (1; 4)	3 (1; 4)	2 (2; 4)			
Lesão											
média ± DP	11,75 ± 0,89	0 ± 0	0,63 ± 0,52	1,5 ± 0,54	1,88 ± 0,35	1,88 ± 0,35	1,75 ± 0,46	2,13 ± 0,84			
mediana (mín.; máx.)	11,5 (11; 13)	0 (0; 0)	1 (0; 1)	1,5 (1; 2)	2 (1; 2)	2 (1; 2)	2 (1; 2)	2 (1; 4)			
Sham											
média ± DP	11,5 ± 0,53	11,63 ± 0,52	11,5 ± 0,54	11,5 ± 0,54	11,5 ± 0,54	11,5 ± 0,54	11,38 ± 0,74	11,5 ± 0,54			
mediana (mín.; máx.)	11,5 (11; 12)	12 (11; 12)	11,5 (11; 12)	11,5 (11; 12)	11,5 (11; 12)	11,5 (11; 12)	11,5 (10; 12)	11,5 (11; 12)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos; Só foram usados os momentos 2, 6 e 12 semanas para a análise e não foi utilizado o grupo Sham.

No Gráfico 1, é possível identificar a evolução dos grupos de camundongos por semana na escala BMS. Todos os grupos no pré-lesão tinham o valor de 9, assim como o grupo 6 (Sham) teve esse valor na escala BMS durante todo o experimento. Para fins de interpretação e análise de gráfico, o tempo pré-lesão e o grupo 6 foram retirados do mesmo.

Gráfico 1 - Evolução do gráfico BMS por semana



A Tabela 2 mostra que a escala BMS dos grupos tratados efetivamente aumentou, em média, estatisticamente a cada momento de avaliação, já nos grupos em que foi utilizado soro fisiológico ou não tratado houve aumento médio estatisticamente significativa de 2 semanas para as demais semanas ($p < 0,05$), mas não houve diferença média estatisticamente significativa de 6 para 12 semanas ($p > 0,05$), apenas em 12 semanas houve diferença média estatisticamente significativa entre os grupos, principalmente entre grupos tratados efetivamente e os grupos em que foi usado soro ou não tratados ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Resultado das comparações múltiplas da escala BMS entre os grupos e momentos de avaliação

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Lesão + 1 dose 3s	2 semanas vs. 6 semanas	-1,88	0,28	<0,001	-2,84	-0,91
	2 semanas vs. 12 semanas	-3,25	0,27	<0,001	-4,21	-2,30
	6 semanas vs. 12 semanas	-1,38	0,28	<0,001	-2,34	-0,41
Lesão + 1 dose 6s	2 semanas vs. 6 semanas	-1,88	0,28	<0,001	-2,84	-0,91
	2 semanas vs. 12 semanas	-3,00	0,27	<0,001	-3,96	-2,05
	6 semanas vs. 12 semanas	-1,13	0,28	0,005	-2,09	-0,16
Lesão + Soro fisiológico 3s	2 semanas vs. 6 semanas	-1,38	0,28	<0,001	-2,34	-0,41
	2 semanas vs. 12 semanas	-1,13	0,27	0,004	-2,08	-0,17
	6 semanas vs. 12 semanas	0,25	0,28	>0,999	-0,71	1,21
Lesão + Soro fisiológico 6s	2 semanas vs. 6 semanas	-2,00	0,28	<0,001	-2,96	-1,04
	2 semanas vs. 12 semanas	-2,63	0,27	<0,001	-3,58	-1,67
	6 semanas vs. 12 semanas	-0,63	0,28	>0,999	-1,59	0,34
Lesão	2 semanas vs. 6 semanas	-1,38	0,28	<0,001	-2,34	-0,41
	2 semanas vs. 12 semanas	-1,25	0,27	0,001	-2,21	-0,30
	6 semanas vs. 12 semanas	0,13	0,28	>0,999	-0,84	1,09
2 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,25	0,27	>0,999	-0,71	1,21
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,13	0,27	>0,999	-0,83	1,08
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,63	0,27	>0,999	-0,33	1,58
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	0,00	0,27	>0,999	-0,96	0,96
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-0,13	0,27	>0,999	-1,08	0,83
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,38	0,27	>0,999	-0,58	1,33
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-0,25	0,27	>0,999	-1,21	0,71
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,50	0,27	>0,999	-0,46	1,46
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-0,13	0,27	>0,999	-1,08	0,83
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-0,63	0,27	>0,999	-1,58	0,33

continua

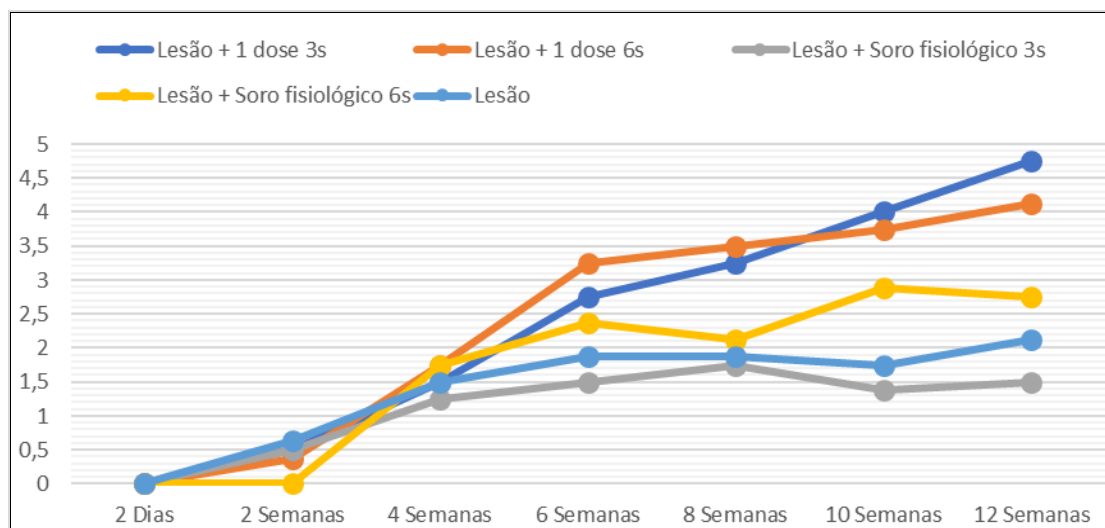
conclusão

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
6 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,25	0,27	>0,999	-0,71	1,21
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,63	0,27	>0,999	-0,33	1,58
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,50	0,27	>0,999	-0,46	1,46
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	0,50	0,27	>0,999	-0,46	1,46
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,38	0,27	>0,999	-0,58	1,33
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,25	0,27	>0,999	-0,71	1,21
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	0,25	0,27	>0,999	-0,71	1,21
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,13	0,27	>0,999	-1,08	0,83
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-0,13	0,27	>0,999	-1,08	0,83
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	0,00	0,27	>0,999	-0,96	0,96
	12 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,50	0,27	>0,999	-0,46
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s		2,25	0,27	<0,001	1,30	3,21
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s		1,25	0,27	0,001	0,30	2,21
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão		2,00	0,27	<0,001	1,05	2,96
Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s		1,75	0,27	<0,001	0,80	2,71
Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s		0,75	0,27	0,637	-0,21	1,71
Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão		1,50	0,27	<0,001	0,55	2,46
Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s		-1,00	0,27	0,027	-1,96	-0,05
Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão		-0,25	0,27	>0,999	-1,21	0,71
Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão		0,75	0,27	0,637	-0,21	1,71

Comparações múltiplas de Bonferroni.

O Gráfico 2 demonstra a evolução dos grupos de camundongos por semana na escala MFS. Todos os grupos no pré-lesão tinham o valor da normalidade, próximo a 11, assim como o grupo 6 (Sham) teve esse valor na escala MFS durante todo o experimento. Para fins de interpretação e análise de gráfico, o tempo pré-lesão e o grupo 6 foram retirados do mesmo.

Gráfico 2 - Evolução do gráfico MFS por semana



Pela Tabela 3, tem-se que o grupo tratado efetivamente mais precocemente apresentou melhora média estatisticamente significativa na escala a cada momento de avaliação ($p < 0,05$), já o grupo tratado efetivamente mais tardiamente apresentou aumento médio na escala apenas de 2 semanas para as demais ($p < 0,05$), assim como os grupos tratado com soro após 6 semanas e o não tratado. Apenas em 12 semanas houve diferenças médias estatisticamente significativa entre os grupos, sendo principalmente os grupos tratados efetivamente com valores em média estatisticamente maiores que os grupos em que foi usado soro ou não tratado ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Resultado das comparações múltiplas da escala MFS entre os grupos e momentos de avaliação

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Lesão + 1 dose 3s	2 semanas vs. 6 semanas	-2,25	0,35	<0,001	-3,46	-1,04
	2 semanas vs. 12 semanas	-4,25	0,39	<0,001	-5,60	-2,90
	6 semanas vs. 12 semanas	-2,00	0,35	<0,001	-3,21	-0,79
Lesão + 1 dose 6s	2 semanas vs. 6 semanas	-2,88	0,35	<0,001	-4,08	-1,67
	2 semanas vs. 12 semanas	-3,75	0,39	<0,001	-5,10	-2,40
	6 semanas vs. 12 semanas	-0,88	0,35	>0,999	-2,08	0,33
Lesão + Soro fisiológico 3s	2 semanas vs. 6 semanas	-1,00	0,35	0,397	-2,21	0,21
	2 semanas vs. 12 semanas	-1,00	0,39	0,990	-2,35	0,35
	6 semanas vs. 12 semanas	0,00	0,35	>0,999	-1,21	1,21
Lesão + Soro fisiológico 6s	2 semanas vs. 6 semanas	-2,38	0,35	<0,001	-3,58	-1,17
	2 semanas vs. 12 semanas	-2,75	0,39	<0,001	-4,10	-1,40
	6 semanas vs. 12 semanas	-0,38	0,35	>0,999	-1,58	0,83
Lesão	2 semanas vs. 6 semanas	-1,25	0,35	0,031	-2,46	-0,04
	2 semanas vs. 12 semanas	-1,50	0,39	0,010	-2,85	-0,15
	6 semanas vs. 12 semanas	-0,25	0,35	>0,999	-1,46	0,96
2 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,13	0,40	>0,999	-1,26	1,51
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,00	0,40	>0,999	-1,39	1,39
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,50	0,40	>0,999	-0,89	1,89
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-0,13	0,40	>0,999	-1,51	1,26
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-0,13	0,40	>0,999	-1,51	1,26
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,38	0,40	>0,999	-1,01	1,76
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-0,25	0,40	>0,999	-1,64	1,14
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,50	0,40	>0,999	-0,89	1,89
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-0,13	0,40	>0,999	-1,51	1,26
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-0,63	0,40	>0,999	-2,01	0,76

continua

conclusão

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
6 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	-0,50	0,40	>0,999	-1,89	0,89
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	1,25	0,40	0,173	-0,14	2,64
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,38	0,40	>0,999	-1,01	1,76
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	0,88	0,40	>0,999	-0,51	2,26
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	1,75	0,40	0,001	0,36	3,14
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,88	0,40	>0,999	-0,51	2,26
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	1,38	0,40	0,056	-0,01	2,76
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,88	0,40	>0,999	-2,26	0,51
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-0,38	0,40	>0,999	-1,76	1,01
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	0,50	0,40	>0,999	-0,89	1,89
12 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,63	0,40	>0,999	-0,76	2,01
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	3,25	0,40	<0,001	1,86	4,64
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	2,00	0,40	<0,001	0,61	3,39
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	2,63	0,40	<0,001	1,24	4,01
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	2,63	0,40	<0,001	1,24	4,01
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	1,38	0,40	0,056	-0,01	2,76
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	2,00	0,40	<0,001	0,61	3,39
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-1,25	0,40	0,173	-2,64	0,14
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-0,63	0,40	>0,999	-2,01	0,76
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	0,63	0,40	>0,999	-0,76	2,01

Comparações múltiplas de Bonferroni.

As Tabelas 4 e 5 mostram que os passos, escorregões e erros da escada horizontal apresentaram comportamento médio dos grupos estatisticamente diferentes ao longo dos momentos de avaliação ($p_{\text{Interação}} < 0,001$), apenas os acertos apresentaram comportamento médio estatisticamente semelhantes dos grupos ao longo dos momentos analisados ($p_{\text{Interação}} = 0,148$), havendo diferença entre os grupos independente do momento analisado ($p_{\text{Grupo}} = 0,028$) .

Tabela 4 - Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações

Variável	Momento					p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré-op.	3 semanas	6 semanas	9 semanas	12 semanas			
Passos						0,010	<0,001	<0,001
Lesão + 1 dose 3s								
média ± DP	45,38 ± 2,62	3,13 ± 2,85	1,13 ± 2,1	2 ± 2,83	5,38 ± 1,41			
mediana (mín.; máx.)	45 (42; 50)	3,5 (0; 7)	0 (0; 5)	0 (0; 6)	5,5 (4; 8)			
Lesão + 1 dose 6s								
média ± DP	46 ± 2,2	1,63 ± 2,39	0 ± 0	3,13 ± 2,8	12,13 ± 2,64			
mediana (mín.; máx.)	46,5 (43; 49)	0 (0; 6)	0 (0; 0)	4 (0; 7)	12,5 (8; 16)			
Lesão + Soro fisiológico 3s								
média ± DP	45,63 ± 1,69	0 ± 0	0,75 ± 2,12	2,13 ± 3,14	4 ± 3,02			
mediana (mín.; máx.)	45 (44; 49)	0 (0; 0)	0 (0; 6)	0 (0; 8)	5 (0; 8)			
Lesão + Soro fisiológico 6s								
média ± DP	46,38 ± 4,63	0 ± 0	4 ± 2,62	7,63 ± 3,46	4,38 ± 2,13			
mediana (mín.; máx.)	44,5 (42; 55)	0 (0; 0)	5 (0; 7)	8 (0; 12)	4 (2; 8)			
Lesão								
média ± DP	45,88 ± 2,53	0 ± 0	4 ± 2,62	4 ± 2,62	4 ± 2,62			
mediana (mín.; máx.)	45 (43; 50)	0 (0; 0)	5 (0; 7)	5 (0; 7)	5 (0; 7)			
Sham								
média ± DP	45,88 ± 2,53	45,88 ± 2,53	47,13 ± 1,96	47,13 ± 1,96	47,13 ± 1,96			
mediana (mín.; máx.)	45 (43; 50)	45 (43; 50)	47 (44; 50)	47 (44; 50)	47 (44; 50)			

continua

Variável	Momento					p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré-op.	3 semanas	6 semanas	9 semanas	12 semanas			
Acertos						0,028	0,089	0,148
Lesão + 1 dose 3s								
média ± DP	45,62 ± 1,85	1 ± 1,41	0,88 ± 1,64	1,25 ± 1,83	3,63 ± 1,41			
mediana (mín.; máx.)	46 (43; 48)	0 (0; 3)	0 (0; 4)	0 (0; 4)	3,5 (2; 6)			
Lesão + 1 dose 6s								
média ± DP	45,38 ± 1,06	1 ± 1,41	0 ± 0	2,25 ± 2,19	10,12 ± 2,1			
mediana (mín.; máx.)	45 (44; 47)	0 (0; 3)	0 (0; 0)	2,5 (0; 6)	11 (7; 12)			
Lesão + Soro fisiológico 3s								
média ± DP	45,63 ± 1,51	0 ± 0	0,5 ± 1,41	1,63 ± 2,39	2,38 ± 2,33			
mediana (mín.; máx.)	45,5 (43; 48)	0 (0; 0)	0 (0; 4)	0 (0; 6)	2 (0; 7)			
Lesão + Soro fisiológico 6s								
média ± DP	45 ± 1,07	0 ± 0	2,38 ± 1,6	6,38 ± 3,11	3,38 ± 2,13			
mediana (mín.; máx.)	45 (44; 47)	0 (0; 0)	3 (0; 4)	7 (0; 11)	3 (1; 7)			
Lesão								
média ± DP	43 ± 1,69	0 ± 0	2,38 ± 1,6	2,38 ± 1,6	2,38 ± 1,6			
mediana (mín.; máx.)	43 (40; 45)	0 (0; 0)	3 (0; 4)	3 (0; 4)	3 (0; 4)			
Sham								
média ± DP	43 ± 1,69	43 ± 1,69	45,63 ± 2	45,63 ± 2	45,63 ± 2			
mediana (mín.; máx.)	43 (40; 45)	43 (40; 45)	45,5 (43; 48)	45,5 (43; 48)	45,5 (43; 48)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos; * Mesmo modelo com número de passos como limitador dos acertos; foram usados somente pré, 6 e 12 semanas e o grupo Sham não foi utilizado nas análises.

Tabela 5 - Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações

Variável	Momento					p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré-op.	3 semanas	6 semanas	9 semanas	12 semanas			
Escorregões						0,004	<0,001	<0,001
Lesão + 1 dose 3s								
média ± DP	0,75 ± 0,71	0,25 ± 0,46	0,25 ± 0,46	0,5 ± 0,76	0,88 ± 0,35			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	0 (0; 2)	1 (0; 1)			
Lesão + 1 dose 6s								
média ± DP	0,88 ± 0,84	0,5 ± 0,76	0 ± 0	0,38 ± 0,52	1,25 ± 0,71			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 2)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	1 (1; 3)			
Lesão + Soro fisiológico 3s								
média ± DP	1 ± 0,76	0 ± 0	0,13 ± 0,35	0,38 ± 0,52	0,88 ± 0,84			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	1 (0; 2)			
Lesão + Soro fisiológico 6s								
média ± DP	1,13 ± 0,64	0 ± 0	0,88 ± 0,64	0,63 ± 0,52	0,63 ± 0,52			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	1 (0; 2)	1 (0; 1)	1 (0; 1)			
Lesão								
média ± DP	0,88 ± 0,64	0 ± 0	0,88 ± 0,64	0,88 ± 0,64	0,88 ± 0,64			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	1 (0; 2)	1 (0; 2)	1 (0; 2)			
Sham								
média ± DP	0,88 ± 0,64	0,88 ± 0,64	1 ± 0,54	1 ± 0,54	1 ± 0,54			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	1 (0; 2)	1 (0; 2)	1 (0; 2)	1 (0; 2)			

continua

Variável	Momento					p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré-op.	3 semanas	6 semanas	9 semanas	12 semanas			
Erros						0,005	<0,001	<0,001
Lesão + 1 dose 3s								
média ± DP	0 ± 0	0,38 ± 0,74	0 ± 0	0,25 ± 0,46	0,88 ± 0,64			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 0)	0 (0; 2)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	1 (0; 2)			
Lesão + 1 dose 6s								
média ± DP	0,25 ± 0,46	0,13 ± 0,35	0 ± 0	0,5 ± 0,54	0,75 ± 0,46			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	0,5 (0; 1)	1 (0; 1)			
Lesão + Soro fisiológico 3s								
média ± DP	0,13 ± 0,35	0 ± 0	0,13 ± 0,35	0,13 ± 0,35	0,75 ± 0,71			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	1 (0; 2)			
Lesão + Soro fisiológico 6s								
média ± DP	0,38 ± 0,52	0 ± 0	0,63 ± 0,74	0,63 ± 0,74	0,38 ± 0,52			
mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	0,5 (0; 2)	0,5 (0; 2)	0 (0; 1)			
Lesão								
média ± DP	0,88 ± 0,64	0 ± 0	0,63 ± 0,74	0,63 ± 0,74	0,63 ± 0,74			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	0,5 (0; 2)	0,5 (0; 2)	0,5 (0; 2)			
Sham								
média ± DP	0,88 ± 0,64	0,88 ± 0,64	0,5 ± 0,54	0,5 ± 0,54	0,5 ± 0,54			
mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	1 (0; 2)	0,5 (0; 1)	0,5 (0; 1)	0,5 (0; 1)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos; * Mesmo modelo com número de passos como limitador dos acertos; foram usados somente pré, 6 e 12 semanas e o grupo Sham não foi utilizado nas análises.

A Tabela 6 mostra que o número de passos diminuiu em média do pré para os demais momentos em todos os grupos, mas aumentou de 6 semanas para 12 semanas apenas nos grupos tratados efetivamente com 3 semanas e 6 semanas ($p = 0,041$ e $p < 0,001$ respectivamente), somente em 12 semanas houve diferença média estatisticamente entre o grupo tratado efetivamente em 6 semanas com os demais grupos ($p < 0,05$), sendo este melhor que os demais em 12 semanas.

Tabela 6 - Resultado das comparações múltiplas dos passos entre os grupos e momentos analisados

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Lesão + 1 dose 3s	pré vs. 6 semanas	44,25	1,20	<0,001	40,1	48,4
	pré vs. 12 semanas	40,00	1,25	<0,001	35,6	44,4
	6 semanas vs. 12 semanas	-4,25	1,20	0,041	-8,4	-0,1
Lesão + 1 dose 6s	pré vs. 6 semanas	46,00	1,20	<0,001	41,8	50,2
	pré vs. 12 semanas	33,88	1,25	<0,001	29,5	38,2
	6 semanas vs. 12 semanas	-12,13	1,20	<0,001	-16,3	-7,9
Lesão + Soro fisiológico 3s	pré vs. 6 semanas	44,88	1,20	<0,001	40,7	49,1
	pré vs. 12 semanas	41,63	1,25	<0,001	37,3	46,0
	6 semanas vs. 12 semanas	-3,25	1,20	0,707	-7,4	0,9
Lesão + Soro fisiológico 6s	pré vs. 6 semanas	42,38	1,20	<0,001	38,2	46,6
	pré vs. 12 semanas	42,00	1,25	<0,001	37,6	46,4
	6 semanas vs. 12 semanas	-0,38	1,20	>0,999	-4,6	3,8
Lesão	pré vs. 6 semanas	41,88	1,20	<0,001	37,7	46,1
	pré vs. 12 semanas	41,88	1,25	<0,001	37,5	46,2
	6 semanas vs. 12 semanas	0,00	1,20	>0,999	-4,2	4,2
Pré	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	-0,63	1,26	>0,999	-5,0	3,8
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-0,25	1,26	>0,999	-4,6	4,1
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-1,00	1,26	>0,999	-5,4	3,4
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-0,50	1,26	>0,999	-4,9	3,9
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,38	1,26	>0,999	-4,0	4,8
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,38	1,26	>0,999	-4,8	4,0
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	0,13	1,26	>0,999	-4,3	4,5
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,75	1,26	>0,999	-5,1	3,6
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-0,25	1,26	>0,999	-4,6	4,1
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	0,50	1,26	>0,999	-3,9	4,9

continua

conclusão

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
6 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	1,12	1,26	>0,999	-3,3	5,5
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,37	1,26	>0,999	-4,0	4,8
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-2,88	1,26	>0,999	-7,3	1,5
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-2,88	1,26	>0,999	-7,3	1,5
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-0,75	1,26	>0,999	-5,1	3,6
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-4,00	1,26	0,151	-8,4	0,4
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-4,00	1,26	0,151	-8,4	0,4
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-3,25	1,26	>0,999	-7,6	1,1
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-3,25	1,26	>0,999	-7,6	1,1
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	0,00	1,26	>0,999	-4,4	4,4
12 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	-6,75	1,26	<0,001	-11,1	-2,4
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	1,38	1,26	>0,999	-3,0	5,8
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	1,00	1,26	>0,999	-3,4	5,4
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	1,38	1,26	>0,999	-3,0	5,8
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	8,13	1,26	<0,001	3,7	12,5
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	7,75	1,26	<0,001	3,4	12,1
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	8,13	1,26	<0,001	3,7	12,5
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,38	1,26	>0,999	-4,8	4,0
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	0,00	1,26	>0,999	-4,4	4,4
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	0,38	1,26	>0,999	-4,0	4,8

Comparações múltiplas de Bonferroni.

A Tabela 7 mostra que, apesar da diferença encontrada entre os grupos (Tabela 4), não é possível identificar quais grupos diferem dos demais ($p > 0,05$), mas sugere que o grupo lesão apenas apresentou em média estatisticamente menos acertos que o grupo tratado efetivamente mais precoce ($p = 0,053$) e que o grupo que recebeu soro fisiológico em 3 semanas ($p = 0,068$).

Tabela 7 - Resultado das comparações múltiplas dos acertos entre os grupos

Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
				Inferior	Superior
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,29	0,52	>0,999	-1,2	1,8
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,04	0,52	>0,999	-1,4	1,5
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,75	0,52	>0,999	-0,7	2,2
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	1,46	0,52	0,053	0,0	2,9
Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-0,25	0,52	>0,999	-1,7	1,2
Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,46	0,52	>0,999	-1,0	1,9
Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	1,17	0,52	0,257	-0,3	2,6
Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,71	0,52	>0,999	-0,8	2,2
Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	1,42	0,52	0,068	-0,1	2,9
Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	0,71	0,52	>0,999	-0,8	2,2

Comparações múltiplas de Bonferroni.

As Tabelas 8 e 9 mostram que os escorregões e erros apresentaram comportamento invertido aos passos (Tabela 7), sendo que houve aumento médio estatisticamente significativo dos escorregões e erros do pré para os demais momentos analisados em todos os grupos ($p < 0,05$), mas apenas o grupo lesão + dose 6 semanas apresentou redução média de 6 para 12 semanas ($p < 0,001$), sendo que em 12 semanas esse grupo apresentou menos escorregões e erros que os demais grupos ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Resultado das comparações múltiplas dos escorregões entre os grupos e momentos analisados

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Lesão + 1 dose 3s	pré vs. 6 semanas	-43,75	1,08	<0,001	-47,5	-40,0
	pré vs. 12 semanas	-40,13	1,12	<0,001	-44,0	-36,2
	6 semanas vs. 12 semanas	3,63	1,08	0,078	-0,1	7,4
Lesão + 1 dose 6s	pré vs. 6 semanas	-45,13	1,08	<0,001	-48,9	-41,4
	pré vs. 12 semanas	-34,25	1,12	<0,001	-38,2	-30,3
	6 semanas vs. 12 semanas	10,88	1,08	<0,001	7,1	14,6
Lesão + Soro fisiológico 3s	pré vs. 6 semanas	-44,00	1,08	<0,001	-47,8	-40,3
	pré vs. 12 semanas	-41,50	1,12	<0,001	-45,4	-37,6
	6 semanas vs. 12 semanas	2,50	1,08	>0,999	-1,3	6,3
Lesão + Soro fisiológico 6s	pré vs. 6 semanas	-42,13	1,08	<0,001	-45,9	-38,4
	pré vs. 12 semanas	-41,50	1,12	<0,001	-45,4	-37,6
	6 semanas vs. 12 semanas	0,63	1,08	>0,999	-3,1	4,4
Lesão	pré vs. 6 semanas	-41,88	1,08	<0,001	-45,6	-38,1
	pré vs. 12 semanas	-41,88	1,12	<0,001	-45,8	-38,0
	6 semanas vs. 12 semanas	0,00	1,08	>0,999	-3,8	3,8
Pré	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,50	1,12	>0,999	-3,4	4,4
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,00	1,12	>0,999	-3,9	3,9
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,63	1,12	>0,999	-3,3	4,6
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	0,38	1,12	>0,999	-3,6	4,3
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-0,50	1,12	>0,999	-4,4	3,4
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,13	1,12	>0,999	-3,8	4,1
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-0,13	1,12	>0,999	-4,1	3,8
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,63	1,12	>0,999	-3,3	4,6
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	0,38	1,12	>0,999	-3,6	4,3
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-0,25	1,12	>0,999	-4,2	3,7

continua

conclusão

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
6 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	-0,87	1,12	>0,999	-4,8	3,1
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-0,25	1,12	>0,999	-4,2	3,7
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	2,25	1,12	>0,999	-1,7	6,2
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	2,25	1,12	>0,999	-1,7	6,2
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,62	1,12	>0,999	-3,3	4,6
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	3,12	1,12	0,571	-0,8	7,1
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	3,13	1,12	0,571	-0,8	7,1
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	2,50	1,12	>0,999	-1,4	6,4
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	2,50	1,12	>0,999	-1,4	6,4
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	0,00	1,12	>0,999	-3,9	3,9
12 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	6,38	1,12	<0,001	2,5	10,3
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-1,38	1,12	>0,999	-5,3	2,6
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,75	1,12	>0,999	-4,7	3,2
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-1,38	1,12	>0,999	-5,3	2,6
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-7,75	1,12	<0,001	-11,7	-3,8
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-7,13	1,12	<0,001	-11,1	-3,2
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-7,75	1,12	<0,001	-11,7	-3,8
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,63	1,12	>0,999	-3,3	4,6
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	0,00	1,12	>0,999	-3,9	3,9
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-0,63	1,12	>0,999	-4,6	3,3

Comparações múltiplas de Bonferroni.

Tabela 9 - Resultado das comparações múltiplas dos erros entre os grupos e momentos analisados

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Lesão + 1 dose 3s	pré vs. 6 semanas	-44,25	1,11	<0,001	-48,1	-40,4
	pré vs. 12 semanas	-40,88	1,16	<0,001	-44,9	-36,8
	6 semanas vs. 12 semanas	3,38	1,11	0,240	-0,5	7,2
Lesão + 1 dose 6s	pré vs. 6 semanas	-45,75	1,11	<0,001	-49,6	-41,9
	pré vs. 12 semanas	-34,38	1,16	<0,001	-38,4	-30,3
	6 semanas vs. 12 semanas	11,38	1,11	<0,001	7,5	15,2
Lesão + Soro fisiológico 3s	pré vs. 6 semanas	-44,88	1,11	<0,001	-48,7	-41,0
	pré vs. 12 semanas	-42,25	1,16	<0,001	-46,3	-38,2
	6 semanas vs. 12 semanas	2,63	1,11	>0,999	-1,2	6,5
Lesão + Soro fisiológico 6s	pré vs. 6 semanas	-42,63	1,11	<0,001	-46,5	-38,8
	pré vs. 12 semanas	-42,00	1,16	<0,001	-46,1	-38,0
	6 semanas vs. 12 semanas	0,63	1,11	>0,999	-3,2	4,5
Lesão	pré vs. 6 semanas	-41,63	1,11	<0,001	-45,5	-37,8
	pré vs. 12 semanas	-41,63	1,16	<0,001	-45,7	-37,6
	6 semanas vs. 12 semanas	0,00	1,11	>0,999	-3,9	3,9
Pré	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,38	1,17	>0,999	-3,7	4,5
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,13	1,17	>0,999	-4,0	4,2
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,63	1,17	>0,999	-3,5	4,7
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-0,38	1,17	>0,999	-4,5	3,7
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-0,25	1,17	>0,999	-4,3	3,8
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,25	1,17	>0,999	-3,8	4,3
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-0,75	1,17	>0,999	-4,8	3,3
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,50	1,17	>0,999	-3,6	4,6
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-0,50	1,17	>0,999	-4,6	3,6
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-1,00	1,17	>0,999	-5,1	3,1

continua

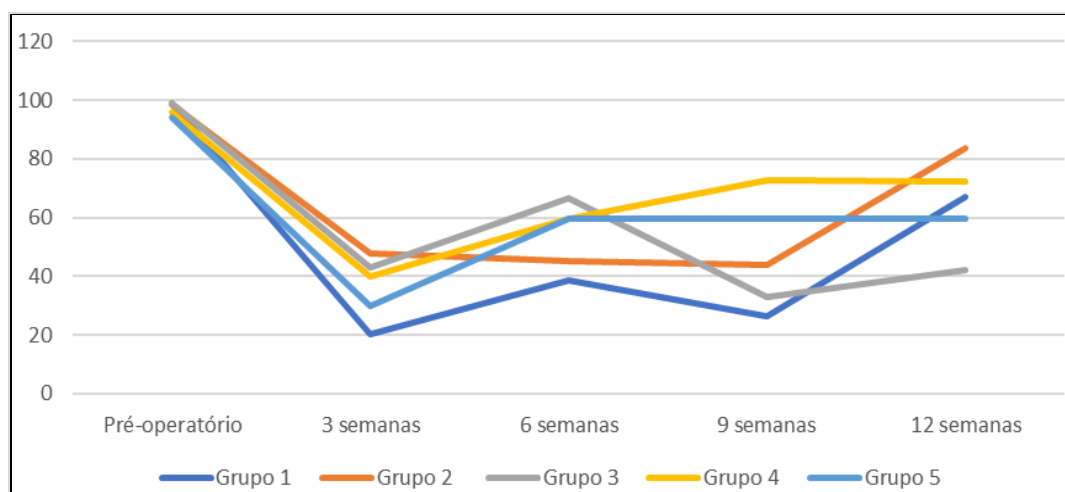
conclusão

Grupo/ Momento	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
6 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	-1,13	1,17	>0,999	-5,2	3,0
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-0,50	1,17	>0,999	-4,6	3,6
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	2,25	1,17	>0,999	-1,8	6,3
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	2,25	1,17	>0,999	-1,8	6,3
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	0,63	1,17	>0,999	-3,5	4,7
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	3,38	1,17	0,399	-0,7	7,5
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	3,38	1,17	0,399	-0,7	7,5
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	2,75	1,17	>0,999	-1,3	6,8
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	2,75	1,17	>0,999	-1,3	6,8
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	0,00	1,17	>0,999	-4,1	4,1
12 semanas	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	6,88	1,17	<0,001	2,8	11,0
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-1,25	1,17	>0,999	-5,3	2,8
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,50	1,17	>0,999	-4,6	3,6
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-1,12	1,17	>0,999	-5,2	3,0
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-8,13	1,17	<0,001	-12,2	-4,1
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-7,38	1,17	<0,001	-11,5	-3,3
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-8,00	1,17	<0,001	-12,1	-3,9
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,75	1,17	>0,999	-3,3	4,8
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	0,13	1,17	>0,999	-4,0	4,2
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-0,62	1,17	>0,999	-4,7	3,5

Comparações múltiplas de Bonferroni.

O gráfico 3 demonstra a evolução dos grupos de camundongos a cada 3 semanas na escala da escada horizontal. Todos os grupos no pré-lesão tinham o valor da normalidade, próximo a 100% de acerto, assim como o grupo 6 (Sham) teve essa média de valores na escala da escada horizontal durante todo o experimento. Para fins de interpretação e análise de gráfico o grupo 6 foi retirado do mesmo.

Gráfico 3 - Percentual de acertos sobre passos tentados



Pela Tabela 10, tem-se que todos os parâmetros histológicos avaliados, qualitativos e quantitativos, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$), exceção apenas do cranial ($p = 0,104$).

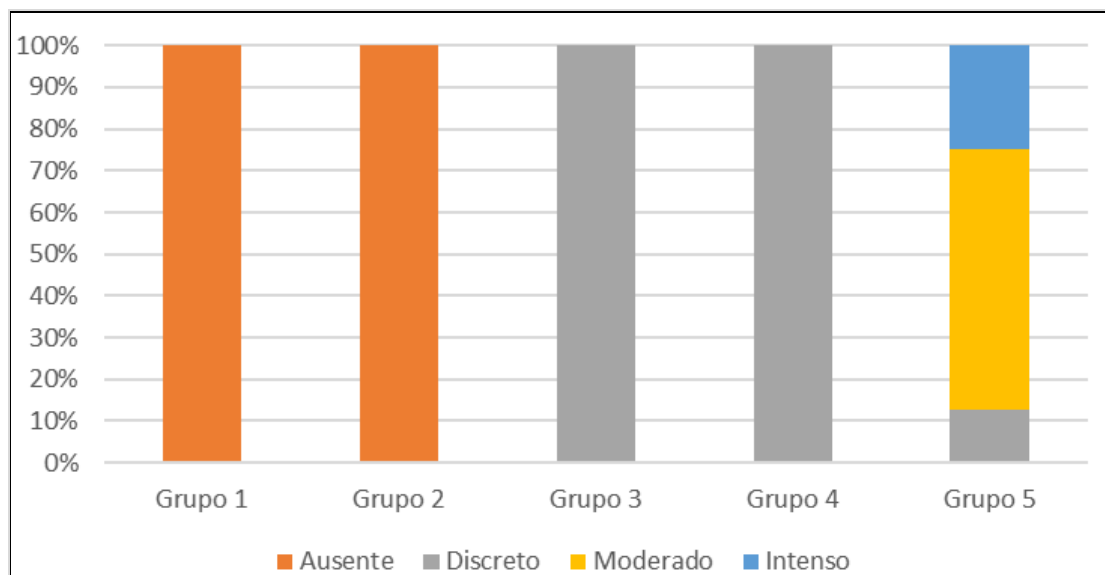
Tabela 10 - Descrição dos parâmetros histológicos segundo grupos e resultado das comparações

Variável	Grupo						p
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	
Necrose							<0,001
Ausente	8 (100)	8 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)	
Discreto	0 (0)	0 (0)	8 (100)	8 (100)	1 (12,5)	0 (0)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (62,5)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	
Hemorragia							<0,001
Ausente	6 (75)	6 (75)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	6 (75)	
Discreto	2 (25)	2 (25)	6 (75)	7 (87,5)	1 (12,5)	2 (25)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	7 (87,5)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Hiperemia							0,004
Ausente	5 (62,5)	5 (62,5)	2 (25)	6 (75)	0 (0)	5 (62,5)	
Discreto	3 (37,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	0 (0)	3 (37,5)	3 (37,5)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	3 (37,5)	2 (25)	4 (50)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	
Degeneração							<0,001
Ausente	8 (100)	8 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)	
Discreto	0 (0)	0 (0)	5 (62,5)	5 (62,5)	5 (62,5)	0 (0)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	3 (37,5)	3 (37,5)	2 (25)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	
Infiltrado							0,001
Ausente	8 (100)	8 (100)	5 (62,5)	7 (87,5)	1 (12,5)	8 (100)	
Discreto	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	5 (62,5)	0 (0)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	2 (25)	1 (12,5)	2 (25)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Cranial							0,104*
média ± DP	522,9 ± 114,5	485,5 ± 90,8	412,4 ± 63,6	444,1 ± 76,8	444,1 ± 63,1	680,6 ± 85,4	
mediana (mín.; máx.)	544 (343; 677)	467 (344; 633)	410,5 (332; 533)	414 (367; 564)	404,5 (389; 544)	683,5 (558; 776)	
Caudal							<0,001*
média ± DP	398,8 ± 56,7	417,4 ± 71,3	239,3 ± 33,9	199,4 ± 55,5	259,8 ± 18,3	697,9 ± 105	
mediana (mín.; máx.)	422 (312; 467)	410 (298; 554)	223,5 (209; 300)	223,5 (115; 256)	260 (233; 289)	704 (553; 839)	

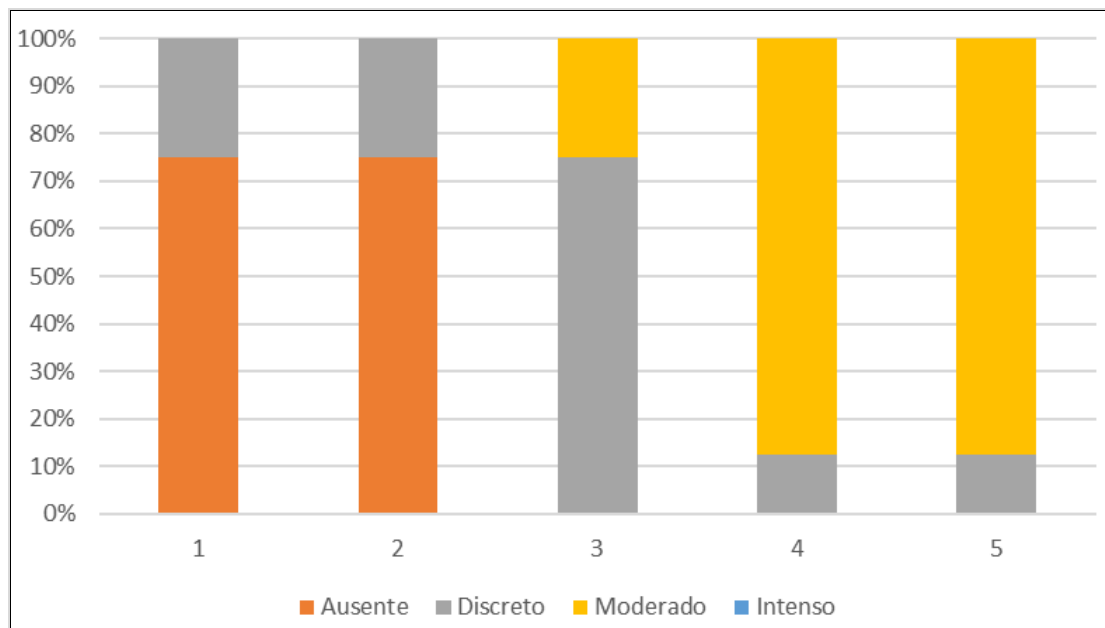
Teste Kruskal-Wallis; * ANOVA; o grupo Sham (grupo 6) não entrou nas análises

Os Gráficos de 4 a 8 comparam os resultados histológicos das diferentes variáveis entre os grupos. Como o grupo 6 não entrou para a análise estatística, ele não foi colocado nesses gráficos. Todos os gráficos possuem significância estatística entre os grupos analisados ($p < 0,05$). O primeiro gráfico compara o grau de necrose na análise histológica entre os grupos analisados, sendo que os grupos de intervenção não apresentaram necrose.

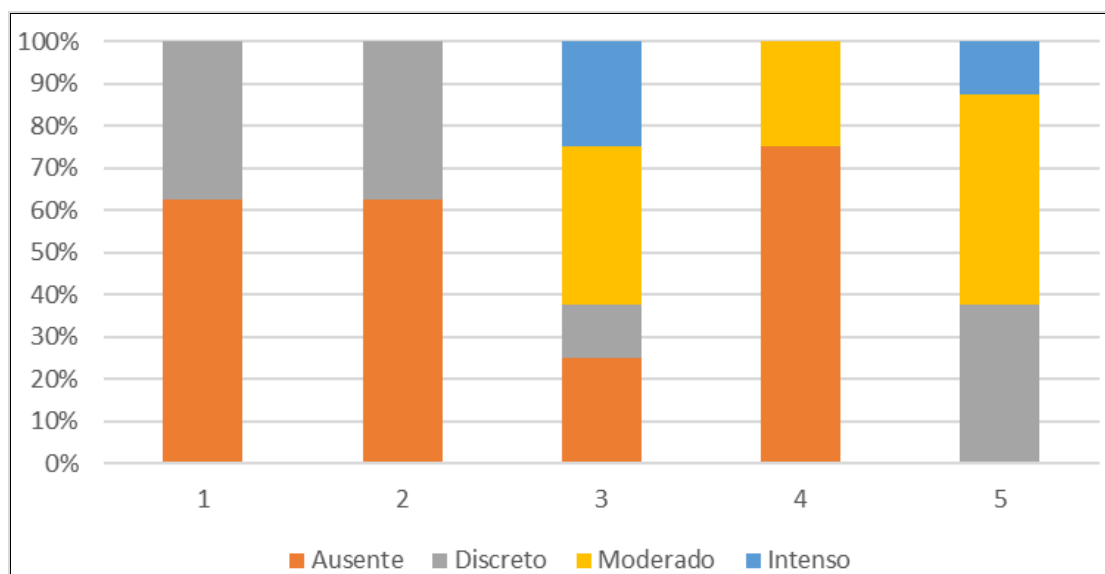
Gráfico 4 - Análise histológica de necrose/grupo



O Gráfico 5 compara o grau de hemorragia na análise histológica entre os grupos analisados. Sendo que os grupos intervenção apresentaram espécimes sem hemorragia ou com hemorragia discreta.

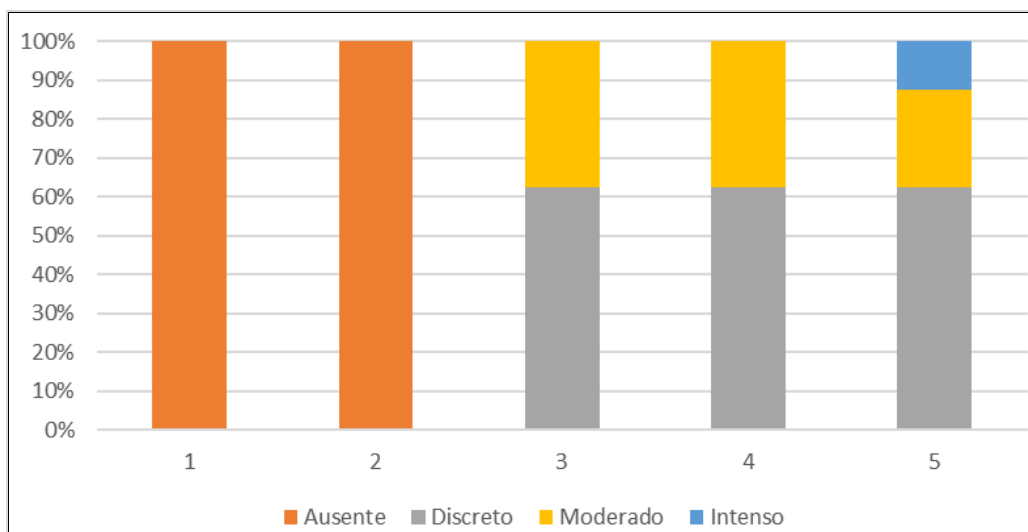
Gráfico 5 - Análise histológica de hemorragia/grupo

O Gráfico 6 compara o grau de hiperemia na análise histológica entre os grupos analisados. Os grupos 3 e 5 que pertencem ao grupo controle, apresentaram alguns camundongos com hiperemia intensa.

Gráfico 6 - Análise histológica de hiperemia/grupo

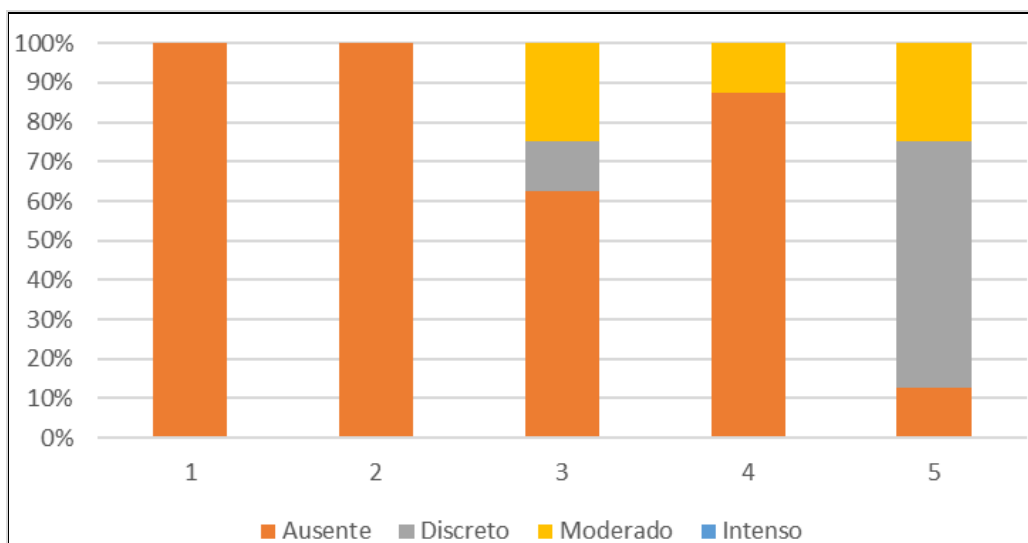
O Gráfico 7 compara o grau de degeneração na análise histológica entre os grupos analisados, sendo que os grupos de intervenção não apresentaram degeneração visível histologicamente.

Gráfico 7 - Análise histológica de degeneração/grupo



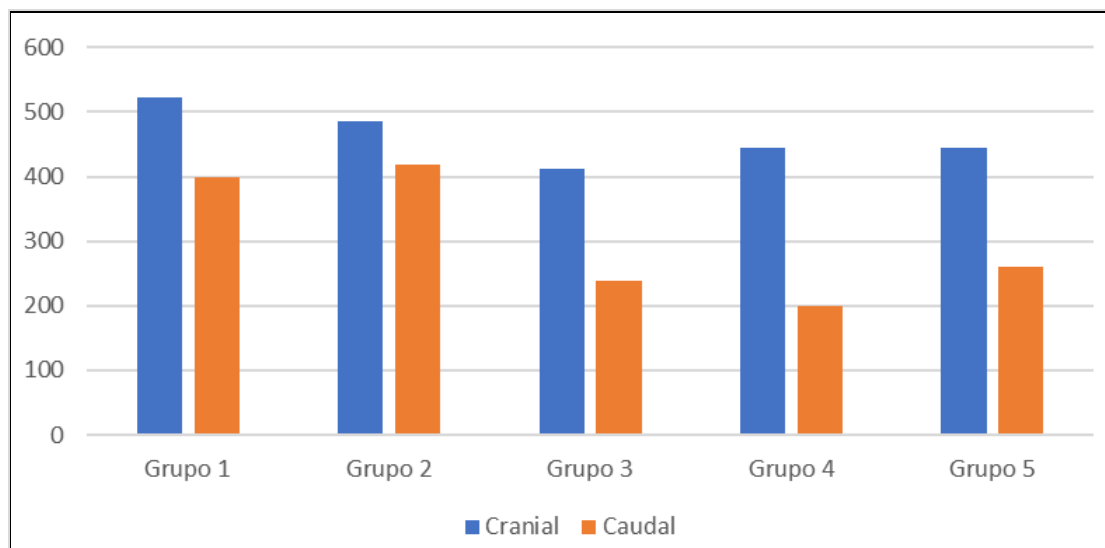
O Gráfico 8 compara o grau de infiltração na análise histológica entre os grupos analisados.

Gráfico 8 - Análise histológica de infiltrado/grupo



O Gráfico 9 mostra o brotamento axonal proximal e caudal no sítio da lesão. Os grupos 1 e 2 mostraram maior brotamento axonal proximal, contudo, sem significância estatística. O mesmo ocorreu no brotamento axonal distal, contudo, apresentando significância estatística.

Gráfico 9 - Análise histológica de brotamento axonal



A Tabela 11 mostra que no geral, os parâmetros histológicos qualitativos foram estatisticamente melhores nos grupos tratados efetivamente que nos grupos tratados com soro fisiológico ou não tratado ($p < 0,05$), apenas o infiltrado celular que foi estatisticamente pior no grupo lesão que em todos os demais grupos ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Resultado das comparações múltiplas entre os grupos dos parâmetros histológicos qualitativos que diferiram entre os grupos

Variável	Comparação	Valor Z	p
Necrose	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,00	>0,999
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-3,74	<0,001
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-3,74	<0,001
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-6,11	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-3,74	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-3,74	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-6,11	<0,001
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,00	>0,999
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-2,38	0,017
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-2,38	0,017
Hemorragia	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,00	>0,999
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-3,40	<0,001
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-2,19	0,028
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-5,31	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-3,40	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-2,19	0,028
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-5,31	<0,001
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	1,20	0,228
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-1,91	0,056
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-3,11	0,002
Hiperemia	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,00	>0,999
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-2,87	0,004
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,14	0,887
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-3,50	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-2,87	0,004
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,14	0,887
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-3,50	<0,001
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	2,73	0,006
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-0,62	0,533
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-3,35	<0,001

continua

Variável	Comparação	Valor Z	conclusão
			p
Degeneração	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,00	>0,999
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-4,49	<0,001
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-4,49	<0,001
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-4,62	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-4,49	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-4,49	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-4,62	<0,001
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	0,00	>0,999
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-0,13	0,897
	Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-0,13	0,897
Infiltrado	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	0,00	>0,999
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-1,80	0,072
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,65	0,514
	Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	-3,78	<0,001
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	-1,80	0,072
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	-0,65	0,514
	Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	-3,78	<0,001
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	1,15	0,252
	Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-1,98	0,048
Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-3,13	0,002	

Comparações múltiplas de Dunn

O parâmetro caudal apresentou em média estatisticamente maior valor nos grupos tratados efetivamente que nos demais grupos ($p < 0,001$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultado das comparações múltiplas entre os grupos do parâmetro histológicos caudal

Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
				Inferior	Superior
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + 1 dose 6s	-18,6	25,4	>0,999	-94,6	57,4
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	159,5	25,4	<0,001	83,5	235,5
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	199,4	25,4	<0,001	123,4	275,4
Lesão + 1 dose 3s vs. Lesão	139,0	25,4	<0,001	63,0	215,0
Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 3s	178,1	25,4	<0,001	102,1	254,1
Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	218,0	25,4	<0,001	142,0	294,0
Lesão + 1 dose 6s vs. Lesão	157,6	25,4	<0,001	81,6	233,6
Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão + Soro fisiológico 6s	39,9	25,4	>0,999	-36,1	115,9
Lesão + Soro fisiológico 3s vs. Lesão	-20,5	25,4	>0,999	-96,5	55,5
Lesão + Soro fisiológico 6s vs. Lesão	-60,4	25,4	0,229	-136,4	15,6

Comparações múltiplas de Bonferroni.

6 DISCUSSÃO

Lesões do sistema nervoso central nos mamíferos, grupo no qual se incluem os humanos, eram tidas como incapazes de se regenerar ou reparar. Porém, viu-se que o tecido tem capacidade de realizar algum tipo de reparo ou regeneração. A restauração, mesmo que limitada, pode gerar grandes benefícios para o paciente lesado medular^{70,71}.

Estudando-se as possibilidades de aumentar a recuperação funcional do paciente com lesão neurológica, várias terapias vêm sendo tentadas, como por exemplo, a terapia com células-tronco. Outra opção que também vem sendo estudada desde o final da década de 1990 são os exoesqueletos. Começou com o exoesqueleto Lokomat, que vinha com um suporte para o peso do corpo e uma esteira associada. Mais modelos foram sendo desenvolvidos ao longo das últimas décadas, cada um com sua peculiaridade e inovação. Hoje em dia há modelos de exoesqueleto que tem diferentes mecanismos de controle da sua movimentação. Atualmente nos EUA, os modelos aprovados para uso são o Ekso, HAL, Indego, REX e ReWalk⁷².

Pode-se classificar os modelos de acordo com o mecanismo de controle, que são por “joystick”, por programa e por eletromiografia (EMG). Os dois primeiros têm o objetivo de reganhar a mobilidade e a musculatura dos membros afetados pela lesão neuronal. Já o controlado pela EMG tem a

mesma função, contudo, como o gatilho para o seu funcionamento é a intenção motora do membro afetado, gera uma integração entre o impulso voluntário do paciente e o suporte mecânico da máquina. Diferentemente dos outros modelos com outros modos de disparo, ele gera ganho de mobilidade nos pacientes mesmo após retirar o exoesqueleto, e até em pacientes com lesões crônicas, se mostrando muito útil para a reabilitação⁷³.

A hipótese para explicar essa integração é o “biofeedback” interativo. Ao se gerar uma intenção motora, o sistema nervoso central gera sinal motor, que é conduzido ao sistema nervoso periférico para iniciar a atividade motora. Isso é detectado pelo EMG e dispara a ação do exoesqueleto conforme a intenção motora. Em pacientes lesados medulares sem o uso desse tipo de exoesqueleto, o pouco movimento gerado pela intenção motora leva a medula receber sinal sensorio inadequado sobre a movimentação, gerando discrepância na integração desse circuito neuronal. O uso do exoesqueleto ativado por EMG, corrige essa discrepância, melhorando o funcionamento neural na área lesada, promovendo a neuroplasticidade⁷³.

Outra frente importante de estudo para a reabilitação de lesões neurológicas, que é tema da presente tese, é o uso de células-tronco nos indivíduos com lesão neurológica. O papel das células-tronco no lesado medular é o de modular a resposta imunológica para diminuir a inflamação no lugar da lesão, liberar fatores nutricionais para promover a recuperação neurológica e estimular a angiogênese para remodelar a barreira hematoencefálica⁷⁴.

As células-tronco mesenquimais promovem a neuroproteção na lesão medular por meio de secreção de fatores de crescimento e citocinas. Pode-se citar dentre esses o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento nervoso (NGF) e o fator de crescimento-1 tipo insulina (IGF-1) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que são fundamentais para a geração de um microambiente adequado para a sobrevivência neuronal e a sua regeneração^{75,76}.

A matriz extracelular, como por exemplo as metaloproteinase, tem papel fundamental no ambiente de recuperação neuronal⁷⁷. As células-tronco mesenquimais apresentam papel importante na sua regulação ao controlar a sua deposição e degradação. Elas também exercem efeito parácrino por meio de liberação de vesículas extracelulares que contém várias moléculas bioativas como proteínas, ácido nucléico e lipídios⁷⁸. Essas vesículas podem transferir o seu conteúdo para células no local da lesão medular, contribuindo assim para a sua expressão gênica, proliferação e diferenciação, tendo como consequência a melhor recuperação neuronal⁷⁹.

O presente estudo foi realizado em camundongos, tendo vantagem em relação aos ratos o menor custo operacional, fácil manuseio e a maior capacidade técnico-científica para a sua edição genética^{80,81}. Essa facilidade de edição genética poderá ser usada em estudos futuros em que se apresente uma dúvida se algum gene ou alguma via metabólica específica influencia na resposta do sistema nervoso central ao implante de células-tronco.

O número de espécimes utilizado na realização da tese foi baseada na padronização definida pela MASCIS, além de estudos realizados nesse laboratório^{61,82} e em outras instituições de pesquisa^{62,80,83} que realizaram trabalhos com modelo experimental equivalente a este.

Ter um modelo de contusão medular amplamente utilizado, padronizado e uniformizado, validado e reproduzível para utilização nos camundongos é fundamental para a realização adequada do experimento e a análise correta de seus resultados. Pelos motivos expostos, foi escolhido o método rotineiramente usado no laboratório e pelo nosso grupo de pesquisa, o NYU/MASCIS que originalmente foi descrito para contusão medular em ratos, e após alguns anos foi validado para o uso em outros animais, como por exemplo, nos saguis e nos camundongos^{61,84}.

A Tabela 1 demonstra que o comportamento médio entre os grupos estudados ao longo dos momentos avaliados tanto para a escala do BMS quanto para o MFS foi estatisticamente diferente, significando que os camundongos apresentaram evolução neuronal distinta entre os diferentes tempos avaliados. Tal resultado era esperado, já que mesmo sem implantação de células-tronco, é esperado que haja alguma recuperação neurológica ao longo do tempo⁸⁵.

Em estudo publicado em 2017²³ em ratos, foi questionada qual seria o melhor tempo decorrido da lesão para a injeção das células-tronco na lesão medular. Foram testados a injeção de células-tronco neurais humanas imediatamente após a lesão, 7 dias após a lesão inicial e 28 dias depois. Todos os grupos tiveram melhora na sua função motora, sendo o grupo da

injeção subaguda (7 dias) que obteve a melhor resposta. Em uma metanálise²⁴, também foi achado que o melhor período para tratamento experimental em ratos com célula-tronco foi o subagudo. Esta metanálise, entretanto não contemplou estudos de injeção de células-tronco na fase crônica, limitando os trabalhos selecionados no período de injeção de 0 a 10 dias de lesão medular. Além disso, há de se levantar questões de diferenças metodológicas que podem pesar na comparação entre os trabalhos citados e a presente tese. Os estudos citados são realizados em ratos, a via de implantação de células-tronco não é unificada entre eles, além da quantidade de células injetadas e o tipo celular ser diferente, sendo de células-tronco neuronais.

Devido à lacuna na literatura por estudos heterogêneos e de qualidade distinta que ainda não trazem informação suficiente, o presente estudo procurou ajudar a responder se o tratamento com células-tronco em camundongos em dois períodos distintos da fase crônica, com 3 semanas e 6 semanas de lesão, traria benefício terapêutico aos animais estudados.

Em outro estudo realizado em ratos, foi injetada células-tronco no sítio da lesão medular com 7 dias e 10 meses. O primeiro grupo mostrou melhora motora comparado aos controles e melhora histológica de remielinização e maior conexão neuronal. O grupo de 10 meses, mostrou que as células-tronco continuavam viáveis no sítio da lesão quando os animais foram sacrificados, contudo os animais não mostraram melhora motora nem histológica em relação aos controles. Ocorre que na fase crônica, a extensa astrogliose mostrou que os axônios foram gradualmente sendo fagocitados

pelos astrócitos, impedindo que novas conexões fossem realizadas pelas células-tronco com os possíveis axônios disponíveis²⁵.

Em trabalho realizado com camundongos, com células-tronco e precursores neurais, foi comparada a colocação de células-tronco na coluna após lesão medular, no evento da lesão (agudo), 7 dias (subagudo) e 3 meses após (crônico). Todos os grupos mostraram aumento de células regenerativas e neutrófilos no sítio da lesão, sendo que os casos crônicos permitiram a diferenciação das células-tronco em neurônios e oligodendrócitos, com um ambiente mais neurogênico que os outros grupos. Os grupos agudo e subagudo demonstraram melhora motora na escala BMS em relação ao controle, diferente do grupo com implantação de células na fase crônica²⁶.

Ao se analisar o Gráfico 1, se vê que houve melhora neurológica parcial ao longo das 12 semanas nos grupos. Os grupos com injeção de células-tronco em 3 semanas e 6 semanas (grupo 1 e 2) foram os que demonstraram maior recuperação neurológica. Na análise estatística foi visto diferença estatisticamente significativa dentro dos grupos nos diferentes tempos, com exceção entre 6 e 12 semanas de lesão nos grupos 3, 4 e 5. Comparando os diferentes grupos em relação ao tempo, achou-se diferença estatística entre os grupos com injeção de células-tronco na 12^a semana, à exceção na comparação dos grupos 1 e 2 e dos grupos 2 e 4.

A presente tese chegou ao resultado de melhor resposta motora nos animais que foram implantados com células-tronco mais próximo da fase subaguda, sendo concordante com os resultados achados pela atual

literatura, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os resultados do grupo 1 e grupo 2. Ao apresentar melhora motora na fase crônica, o presente estudo sugere que pode haver uma lacuna de tempo na fase crônica onde ainda é viável o transplante de células-tronco no sítio da lesão, onde não haja tanta astrogliose e ainda tenham axônios viáveis para novas conexões neurais e mais possibilidades para a neuroplasticidade²⁵.

Há múltiplas variáveis que dificultam um avanço mais rápido da ciência quanto ao melhor tratamento possível de células-tronco em pacientes com lesão medular. Pode-se citar tempo de lesão para implantação de células-tronco, via de implantação, tipo de célula-tronco e o volume celular implantado. Esta última variável foi estudada por Cao *et al.*⁸⁶ ao se comparar diferentes doses implantadas em ratos com 7 dias de lesão medular. Os grupos eram de baixa dose ($0,25 \times 10^6$ células/kg), média dose (1×10^6 células/kg) e alta dose (4×10^6 células/kg). Os grupos de média e alta dose tiveram melhora motora mais relevante que o grupo de baixa dose em relação ao controle. O presente trabalho apresenta a injeção em tempo diferente do estudo acima, com dose fixa de 4×10^5 células. Como a dose de células usada em ambos os trabalhos são com medidas diferentes, deve-se colocar na mesma medida para fazer comparação entre os resultados dos estudos. Levando-se em conta o estudo usou ratos Sprague-Dawley fêmeas⁸⁶ e que a média de peso desses animais é de 250 g, e dos camundongos Balb-C da presente tese é de aproximadamente 30 g, os grupos do trabalho de Cao *et al.*⁸⁶ teriam as doses por animal divididos da seguinte maneira: baixa dose com $0,625 \times 10^5$ células/animal, média dose

2,5 x 10⁵ células/animal e alta dose 1 x 10⁶ células/animal. Ao se ajustar o peso do camundongo para rato, é necessário multiplicar por cinco o número de células implantadas, sendo que seria 2 x 10⁶ células/animal, ou seja, se enquadraria no grupo de alta dose. Ambos os trabalhos mostram melhora estatisticamente significativa em relação aos controles para os grupos de alta dose, corroborando com o resultado da presente tese. Ao se tirar as conclusões, têm que se levar em conta as diferenças metodológicas dos estudos, como diferença do tempo de injeção e tipo de animal utilizado no estudo.

A análise do Gráfico 2 em conjunto com a Tabela 3, demonstra melhor recuperação neurológica dos grupos que foram realizados implante de células-tronco em relação aos outros grupos, principalmente ao se comparar os grupos com 12 semanas de lesão. Ao se comparar os resultados obtidos pela escala do BMS e do MFS, apesar de não serem idênticas, são bastante parecidas, o que é condizente com análises realizadas na literatura médica^{61,83,87}. Ung *et al.*⁸³ compararam as escalas Basso, Beattie and Bresnahan (BBB), Basso Mouse Score (BMS), Antri, Orsal and Barthe (AOB), Motor Function Score (MFS) e Averaged Combined Score (ACOS), em camundongos com lesão medular produzida e avaliou a recuperação espontânea dos mesmos até 5 semanas. À exceção da ACOS, todas obtiveram resultados semelhantes.

As duas escalas utilizadas, BMS e MFS, são bastante utilizadas para avaliação funcional, específicas para camundongos, apresentam excelente concordância inter e intraobservador^{58,67}. Em outro estudo feito no

laboratório em que foi realizado este estudo, Torelli *et al.*⁸⁷ estudaram o efeito dos gangliosídeos GM1 e eritropoietina em camundongos com lesão medular, e assim como o estudo de Ung *et al.*⁸³, os resultados das escalas BMS e MFS foram semelhantes, o que é concordante com os achados na presente tese.

Foi utilizada outra escala para avaliação motora e da propriocepção dos camundongos, o teste da escada horizontal. Como esperado, houve diferença estatística entre os passos e erros entre os diferentes grupos e nos diferentes períodos analisados. Tal resultado é esperado já que após a lesão medular e as diferentes intervenções, espera-se que haja distinção entre as recuperações neurológicas entre os diferentes grupos analisados. Achou-se também que o aumento do número de passos ao longo das semanas ocorreu efetivamente apenas nos grupos intervenção. Tais dados são condizentes com os achados da literatura médica, com maior melhora no número de passos, aumento de acertos e diminuição de erros^{57,88}.

Após a observação dos camundongos por 12 semanas, foi realizado o sacrifício dos animais para a análise histopatológica. O traumatismo raquimedular, do ponto de vista histológico, apresenta destruição mecânica que leva a hemorragia, diminuição da perfusão, hipoxia tecidual, edema e, por último, necrose dos elementos neurais. Nos grupos estudados nesse trabalho, os achados mostraram algum grau de alteração morfológica a depender do tratamento instituído, o que é condizente com os achados da literatura médica⁸⁹.

Dentre os grupos de intervenção foi achado melhor resultado histopatológico em todos os aspectos analisados, como necrose, hemorragia, infiltrado celular, hiperemia e degeneração, com significância estatística. Além disso, o brotamento axonal distal foi maior nos grupos de intervenção do que nos outros grupos, com significância estatística, e com tendência a ser maior o brotamento axonal proximal, contudo, sem significância estatística.

Em um trabalho recente, foi realizado implante de células mesenquimais no dia da lesão associado a treinamento físico em esteira com seguimento dos camundongos por 8 semanas. Na análise histológica foi achada infiltração leve de células inflamatórias no tecido lesado. Já o grupo controle (lesão) foi achada infiltração grave de células inflamatórias⁵⁷. Os resultados se assemelham ao da presente tese contudo não são idênticos. Tal diferença pode ser explicado pela diferença do volume celular (1×10^5 vs. 4×10^5), origem celular (medula óssea vs. cordão umbilical), tempo da lesão para injeção (imediate vs. 3 e 6 semanas) e o tempo para o sacrifício do animal (8 semanas vs. 12 semanas).

Outros estudos, com diferentes métodos, apontam resultados semelhantes de recuperação neuronal do ponto de vista histológico. Ai Takahashi *et al.*⁹⁰, em estudo realizado com ratos e com células mesenquimais advindas de tecido adiposo, encontraram melhora histológica com transplante de células-tronco associado ou não ao exercício, com menor formação de escara e cavidade no sítio da lesão com 4 semanas do trauma. Apesar da melhora histológica ter ocorrido realizando ou não

exercícios, a melhora motora só ocorreu nos ratos que realizaram programa de exercício. Tal discrepância clínico-histológica é compatível com situações da vida real em humanos, sendo que tais situações ocorrem com frequência nos consultórios médicos. Son *et al.*⁹¹ em estudo realizado em ratos com células-tronco criadas a partir de engenharia genética (células-tronco pluripotentes induzidas), observaram melhora histológica por método diferente do HE, associado a melhora motora dos ratos estudados, sendo que o transplante de células-tronco foi realizado imediatamente após a lesão e os animais foram sacrificados com 8 semanas da lesão medular. Outro dado que é condizente com o estudo atual é que houve aumento do brotamento axonal tanto proximal quanto distal.

Avaliando as questões que ainda permeiam os estudos de implante de células-tronco, uma que não foi discutida é a rota escolhida para fazer a aplicação celular. Cada via de acesso apresenta vantagens e desvantagens teóricas que valem a pena ser estudadas para se dirimir as dúvidas sobre as qualidades e imperfeições de cada escolha. A via intravenosa apresenta a vantagem de ser a de acesso mais fácil, ser menos trabalhosa para a realização da implantação e ser de baixo custo. Algumas de suas desvantagens seriam a falha na migração para o local da lesão, a incapacidade de passar a barreira hematoencefálica e criação de neoplasias nos órgãos por onde passam as células-tronco. Tais desvantagens não se mostraram verdade tanto nos trabalhos em animais quando nos estudos clínicos que vem sendo realizados em humanos. Contudo, o problema da rota intravenosa, é a pequena quantidade de células que chega ao sítio

lesionado, diminuindo assim a eficácia do tratamento nos pacientes com déficit neurológico. A maior parte das células infundidas ficam presas no pulmão, diminuindo o número total de células disponíveis para passar a barreira hematoencefálica e chegar ao sítio lesionado. A via intralesional, apesar de ser bastante realizada em modelos animais, levanta questões sobre a sua aplicação prática em seres humanos. As lesões traumáticas medulares na coluna do ser humano não costumam ser uma lesão aberta, onde a dura-máter já estaria naturalmente exposta no momento do tratamento cirúrgico da coluna com fixação e estabilização do segmento. Desse modo, seria necessário abrir a medula no sítio lesionado para assim injetar o volume adequado de células-tronco. A implantação intralesional em seres humanos levanta a questão do risco de complicações inerentes ao procedimento cirúrgico, como infecção e fístula liquórica, além de também poder ser causa de um novo trauma na medula espinhal do doente, agora vindo de modo iatrogênico. Levantada essas questões, se chegou à pergunta de que se não seria melhor fazer a implantação via injeção intratecal⁵⁵.

Em estudo de 2009, Paul *et al.*⁹² compararam a via de implantação venosa e intratecal por punção lombar em grupos de ratos. Ao final do estudo foram realizadas análises imuno-histoquímica e histológica dos espécimes, tendo sido visto que por punção houve maior concentração de células-tronco no sítio da lesão, menor área de lesão, maior enxertia das células no tecido e menor resposta imunológica do hospedeiro contra a lesão. Porém, tal trabalho não realizou nenhuma avaliação motora nos ratos

estudados. Em estudo mais recente, de 2022, Liu *et al.*⁹³ fizeram trabalho semelhante ao descrito anteriormente, comparando injeção intratecal por punção lombar e injeção intravenosa. Neste trabalho, compararam também diferentes doses de injeção intratecal, comparando $2,5 \times 10^6$ células/kg, 5×10^6 células/kg e 10×10^6 células/kg. A análise foi realizada por meio do BBB para avaliação motora, da ressonância magnética, da histopatologia e da imuno-histoquímica. Apresentaram os melhores resultados, em linhas gerais, os animais submetidos a injeção intratecal com o maior número de células implantados. Os estudos acima argumentam que usaram a via intratecal ao invés da via intralesional, pois assim poderiam acabar traumatizando a medula do animal novamente.

Em metanálise de 2022, Shang *et al.*⁵⁵ analisaram qual a melhor rota para a implantação de células-tronco. A equipe do estudo chegou à conclusão de que a melhor rota é a intralesional, já que mostra melhores resultados nos estudos analisados em sua revisão. Entretanto, o estudo alega que o número de trabalhos de injeção intratecal é insuficiente na literatura para ajudar na sua comparação com os outros tipos de via de implantação. Seguindo as atuais evidências da literatura médica, o presente estudou utilizou a rota de implantação com mais dados a favor de ser a de escolha para o tratamento deste tipo de lesão.

A presente tese apresenta resultados relevantes para os estudos do uso de células-tronco no lesado medular, contribuindo assim para que se esteja cada vez mais próximo do uso clínico inteiramente disponível para a população necessitada. Apesar dos desfechos importantes, o estudo

também apresenta falhas. Os mecanismos de reparação neuronal em ratos se assemelham mais a espécie humana do que a reparação dos camundongos quando comparados com humanos. Teoricamente esse estudo seria mais adequado em ratos, contudo a grande variabilidade de linhagens isogênicas e a facilidade de engenharia genética em camundongos abrem portas para o conhecimento que são mais difíceis de se transpassar com os ratos. Pode-se, por exemplo, em estudos futuros fazer linhagem de camundongo com bloqueio de enzima específica da via inflamatória que poderia estar atrapalhando uma melhor recuperação motora do uso de células-tronco na fase crônica do trauma raquimedular. Outra falha do estudo foi a falta de realização de mais métodos de análise. O estudo seria mais robusto caso o estudo tivesse realizado análises de exames de imagem como com a ressonância magnética, tivesse realizado imuno-histoquímica para avaliar a composição celular e a expressão dos receptores no sítio da lesão. Poderia também ter sido realizada a eletroneuromiografia ao final do estudo para outro tipo de análise da recuperação neuromotora, com viés de prognóstico mais longo, já que poderia mostrar se os neurônios ainda estavam em fase de remielinização. Ao final dessas ponderações, vê-se que apesar das falhas, o presente estudo traz informações importantes e inéditas para a literatura científica sobre o resultado da implantação de células-tronco em camundongos em diferentes períodos da fase crônica, contribuindo assim para o avanço científico e utilização das células-tronco na prática clínica.

7 CONCLUSÃO

A presente tese demonstrou que a implantação em camundongos de células-tronco mononucleares obtidas em sangue de cordão umbilical e placenta humanos no sítio da lesão, 3 semanas a 6 semanas após o trauma raquimedular, melhoram a resposta motora e histopatológica dos mesmos.

8 ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da Injeção em Dose Única de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal após 3 semanas e 6 semanas do Traumaraquimedular em Camundongos**”, registrada com o nº **1248/2019**, sob a responsabilidade de **Alexandre Fogaça Cristante** e **Thiago Pedro Freitas Araujo**, apresentada pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 22.05.19

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 04-03-2019 Término: 20-07-2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/c
Nº total	60
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	machos
Origem	Bioterio Central da FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 22 de Maio de 2019

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal em Camundongos

(TCLE versão 1/ colocar data)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº: APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº: APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação da Injeção em Dose Única de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal após 3 semanas e 6 semanas do Traumaraquimedular em Camundongos

PESQUISADOR: Alexandre Fogaça Cristante e Alex Oliveira Araújo
 CARGO/FUNÇÃO: médico (a) INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 90.738
 UNIDADE DO HCFMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo / Instituto de Ortopedia e Traumatologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 14 meses

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal em Camundongos

(TCLE versão 1/ colocar data)

4 – 1 – Desenho do estudo e objetivo (s):

O objetivo deste estudo, para o qual está sendo solicitada a coleta e processamento do sangue de cordão umbilical e placentário do seu bebê, é provar que a injeção de células tronco do sangue do cordão umbilical é capaz de auxiliar no tratamento de lesões na coluna espinhal de camundongos.

O estudo consiste em sua participação voluntária para autorizar a coleta e o processamento do sangue de cordão umbilical e placentário do seu bebê para que essas células sejam testadas no tratamento de animais submetidos a lesão da coluna vertebral. Os animais serão submetidos experimentalmente a uma lesão medular que simula a lesão espinhal ocorrida em seres humanos vítimas de acidentes que levam a paraplegia e tetraplegia. Alguns estudos mostram que a injeção de células tronco no local da lesão, auxilia na recuperação dos animais. Nesse estudo, pretendemos testar também a quantidade de células e a frequência da infusão dessas células, para verificar se essas mudanças são capazes de reverter a lesão na coluna espinhal.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados:

O sangue de cordão umbilical e placentário do seu bebê será coletado por médicos e/ou enfermeiras, treinadas pela equipe da Cryopraxis, imediatamente após o nascimento. Esta coleta não traz risco nem para a mãe nem para o bebê, uma vez que ela é realizada em um material que rotineiramente costuma ser descartado segundo as normas sanitárias vigentes e o procedimento só é iniciado após o nascimento do bebê e sua entrega para os cuidados da equipe de pediatria. Após a coleta do sangue do cordão umbilical do bebê, a bolsa de coleta contendo o sangue de cordão umbilical e placentário será guardado em frascadeira térmica específica e transportado até o laboratório da Cryopraxis, com temperatura monitorada/registrada durante todo o trajeto. A seguir, ele será processado, congelado e enviado de volta ao Instituto de Ortopedia para utilização nos animais.

3 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do item 2:

Para a coleta do sangue de cordão umbilical e placentário, não se identificam riscos ou desconfortos envolvidos nem para a mãe nem para o bebê. Os riscos para a equipe da pesquisa estão relacionados à contaminação com material biológico, inerentes aos cuidados

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal em Camundongos

(TCLE versão 1/ colocar data)

com saúde, que são minimizados uma vez que o profissional responsável pela coleta dos materiais biológicos deverá estar protegido pelos equipamentos de proteção individual como os mesmos dispositivos de segurança usados pelos demais membros da equipe de saúde, como capote cirúrgico, gorro, máscara e luvas estéreis.

4 – Benefícios para o participante:

Não está previsto qualquer benefício imediato ao participante da pesquisa. O participante não terá o direito de manter as células tronco armazenadas no banco de células da Cryopraxis, para uso próprio no futuro. Entretanto, o projeto se propõe a esclarecer os aspectos ainda desconhecidos, no modelo animal, da lesão da coluna espinhal em camundongos e poderá no futuro, oferecer alternativas de tratamento. Em atendimento às diretrizes previstas na Resolução CNS 441/11 e Portaria MS 2201/11, uma parte de sangue de cordão umbilical e placentário (amostra de referência) será mantida armazenada pelo período de duração do projeto, para garantia do acesso gratuito às informações associadas ao material biológico utilizado.

Decorrido os prazos descritos acima, o material será descartado segundo as normas de sanitárias vigentes e não será utilizado em outros projetos.

5 – 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 Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristate que pode ser encontrado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Rua Dr. Ovidio Pires de Campo, 333 – 2º andar, tel: 2661-6912. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**CEP-FMUSP**): Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000, horário de atendimento: 8:00-17:00h; Tel: (11) 3893-4401/4407 E-mail: cep.fm@usp.br

6 – Será garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal em Camundongos

(TCLE versão 1/ colocar data)

7 – Os senhores serão informados sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

8 – Não haverá despesas pessoais para os senhores em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Sua participação acaba após a coleta do sangue do cordão umbilical de seu filho.

9 – O pesquisador se compromete a utilizar os dados e os materiais coletados somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito dos dados que li ou que foram lidos para mim, descrevendo o estudo “**Avaliação da Injeção em Dose Única de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal após 3 semanas e 6 semanas do Traumaraquimedular em Camundongos**”. Eu discuti com o **Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar 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 possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

10 - Garantia de indenização: O (A) senhor(a) tem direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

**Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da
Medula Espinhal em Camundongos**

(TCLE versão 1/ colocar data)

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, 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 paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Rubrica do participante
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

9 REFERÊNCIAS

1. Fouad K, Krajacic A, Tetzlaff W. Spinal cord injury and plasticity: opportunities and challenges. *Brain Res Bull.* 2011;84(4-5):337-42.
2. Rahimi-Movaghar V, Sayyah MK, Akbari H, Khorramirouz R, Rasouli MR, Moradi-Lakeh M, Shokrane F, Vaccaro AR. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries: a systematic review. *Neuroepidemiology.* 2013;41(2):65-85.
3. Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, Nouri A, Fehlings MG. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol.* 2014 Sep 23;6:309-31.
4. Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord.* 2006;44(9):523-9.
5. Lidal IB, Huynh TK, Biering-Sørensen F. Return to work following spinal cord injury: a review. *Disabil Rehabil.* 2007;29(17):1341-75.
6. Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC, Wuermser LA, Ho CH. Spinal cord injury medicine. 6. Economic and societal issues in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007;88(3 Suppl 1):S84-8.

7. Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 2014;114:25-57.
8. Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2006;23(3-4):264-80.
9. Trivedi A, Olivas AD, Noble-Haeusslein LJ. Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes. *Clin Neurosc Res.* 2006;6(5):283-92.
10. Sekhon LHS, Fehlings MG. Epidemiology, Demographics, and Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24):S2-12.
11. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999;49(6):377-91.
12. Tetzlaff W, Okon EB, Karimi-Abdolrezaee S, Hill CE, Sparling JS, Plemel JR, Plunet WT, Tsai EC, Baptiste D, Smithson LJ, Kawaja MD, Fehlings MG, Kwon BK. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2011;28(8):1611-82.
13. Bracken MB. Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;1(1):CD001046.

14. Kwon BK, Okon E, Hillyer J, Mann C, Baptiste D, Weaver LC, Fehlings MG, Tetzlaff W. A systematic review of non-invasive pharmacologic neuroprotective treatments for acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2011;28(8):1545-88.
15. Vedantam A, Levi AD. Hypothermia for Acute Spinal Cord Injury. *Neurosurg Clin N Am*. 2021;32(3):377-87.
16. Aghazadeh J, Samadi Motlagh P, Salehpour F, Meshkini A, Fatehi M, Mirzaei F, Naseri Alavi SA. Effects of Atorvastatin in Patients with Acute Spinal Cord Injury. *Asian Spine J*. 2017;11(6):903-7.
17. Badhiwala JH, Wilson JR, Witiw CD, Harrop JS, Vaccaro AR, Aarabi B, Grossman RG, Geisler FH, Fehlings MG. The influence of timing of surgical decompression for acute spinal cord injury: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Neurol*. 2021;20(2):117-26.
18. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-68.
19. Veneruso V, Rossi F, Vilella A, Bena A, Forloni G, Veglianesi P. Stem cell paracrine effect and delivery strategies for spinal cord injury regeneration. *J Control Release*. 2019;300:141-53.
20. Vismara I, Papa S, Rossi F, Forloni G, Veglianesi P. Current Options for Cell Therapy in Spinal Cord Injury. *Trends Mol Med*. 2017;23(9):831-49.

21. Papa S, Vismara I, Mariani A, Barilani M, Rimondo S, De Paola M, Panini N, Erba E, Mauri E, Rossi F, Forloni G, Lazzari L, Veglianese P. Mesenchymal stem cells encapsulated into biomimetic hydrogel scaffold gradually release CCL2 chemokine in situ preserving cytoarchitecture and promoting functional recovery in spinal cord injury. *J Control Release*. 2018;278:49-56.
22. Wang Z, Fang B, Tan Z, Zhang D, Ma H. Hypoxic preconditioning increases the protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells on spinal cord ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2016;13(3):1953-60.
23. Cheng I, Park DY, Mayle RE, Githens M, Smith RL, Park HY, Hu SS, Alamin TF, Wood KB, Kharazi AI. Does timing of transplantation of neural stem cells following spinal cord injury affect outcomes in an animal model? *J Spine Surg*. 2017;3(4):567-71.
24. Shang Z, Li D, Chen J, Wang R, Wang M, Zhang B, Wang X, Wanyan P. What Is the Optimal Timing of Transplantation of Neural Stem Cells in Spinal Cord Injury? A Systematic Review and Network Meta-Analysis Based on Animal Studies. *Front Immunol*. 2022;13:855309.
25. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2005;25(19):4694-705.

26. Kumamaru H, Saiwai H, Kubota K, Kobayakawa K, Yokota K, Ohkawa Y, Shiba K, Iwamoto Y, Okada S. Therapeutic activities of engrafted neural stem/precursor cells are not dormant in the chronically injured spinal cord. *Stem Cells*. 2013;31(8):1535-47.
27. de la Torre JC. Spinal cord injury models. *Prog Neurobiol*. 1984;22(4):289-344.
28. Kunkel-Bagden E, Dai H-N, Bregman BS. Recovery of Function after Spinal Cord Hemisection in Newborn and Adult Rats: Differential Effects on Reflex and Locomotor Function. *Exp Neurol*. 1992;116(1):40-51.
29. Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEPd. Standardization of spinal cord injury in Wistar rats. *Acta Ortop Bras*. 2010;18(4):182-8.
30. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med*. 2013;110(3):207-11.
31. Kalra K, Tomar PC. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *AJPCT*. 2014;2(7):919-30.
32. Ottoboni L, von Wunster B, Martino G. Therapeutic Plasticity of Neural Stem. *Front Neurol*. 2020;11(148).
33. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10.

34. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
35. Herberts CA, Kwa MS, Hermsen HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med*. 2011;9:29.
36. Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(1):32-9.
37. Liao LL, Ruszymah BHI, Ng MH, Law JX. Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Curr Res Transl Med*. 2020;68(1):5-16.
38. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*. 2016;37(1):115-25.
39. Hossne NA Jr, Invitti AL, Buffolo E, Azevedo S, Rodrigues de Oliveira JS, Stolf NG, Cruz LE, Sanberg PR. Refractory angina cell therapy (ReACT) involving autologous bone marrow cells in patients without left ventricular dysfunction: a possible role for monocytes. *Cell Transplant*. 2009;18(12):1299-310.

40. Henning RJ, Abu-Ali H, Balis JU, Morgan MB, Willing AE, Sanberg PR. Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells for the Treatment of Acute Myocardial Infarction. *Cell Transplantation*. 2004;13:729-39.
41. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*. 1997;337(6):373-81.
42. Broxmeyer HE. Umbilical cord transplantation: epilogue. *Semin Hematol*. 2010;47(1):97-103.
43. Matsumoto T, Mugishima H. Non-hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. *Int J Stem Cells*. 2009;2(2):83-9.
44. Liau LL, Looi QH, Chia WC, Subramaniam T, Ng MH, Law JX. Treatment of spinal cord injury with mesenchymal stem cells. *Cell Biosci*. 2020;10:112.
45. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, Troyer D, McIntosh KR. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*. 2008 Nov;26(11):2865-74.

46. Yang CC, Shih YH, Ko MH, Hsu SY, Cheng H, Fu YS. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS One*. 2008;3(10):e3336.
47. Leibacher J, Henschler R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:7.
48. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, Teramoto K, Arai S, Sato C, Takase K, Yasumizu T, Teraoka H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells*. 2003;21(2):217-27.
49. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(11):581-8.
50. Chen N, Kamath S, Newcomb J, Hudson J, Garbuzova-Davis S, Bickford P, Davis-Sanberg C, Sanberg P, Zigova T, Willing A. Trophic factor induction of human umbilical cord blood cells in vitro and in vivo. *J Neural Eng*. 2007 Jun;4(2):130-45.
51. Chua SJ, Bielecki R, Yamanaka N, Fehlings MG, Rogers IM, Casper RF. The effect of umbilical cord blood cells on outcomes after experimental traumatic spinal cord injury. *Spine*. 2010;35(16):1520-6.

52. Dasari VR, Spomar DG, Li L, Gujrati M, Rao JS, Dinh DH. Umbilical Cord Blood Stem Cell Mediated Downregulation of Fas Improves Functional Recovery of Rats after Spinal Cord Injury. *Neurochem Res.* 2008;33(1):134-49.
53. Galieva LR, Mukhamedshina YO, Arkhipova SS, Rizvanov AA. Human Umbilical Cord Blood Cell Transplantation in Neuroregenerative Strategies. *Front Pharmacol.* 2017;8:628.
54. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med.* 1999;5(12):1410-2.
55. Shang Z, Wang R, Li D, Chen J, Zhang B, Wang M, Wang X, Wanyan P. Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Therapeutic Strategies Based on 15 Types of Stem Cells in Animal Models. *Front Pharmacol.* 2022;13:819861.
56. Kao CH, Chen SH, Chio CC, Lin MT. Human umbilical cord blood-derived CD34+ cells may attenuate spinal cord injury by stimulating vascular endothelial and neurotrophic factors. *Shock.* 2008;29(1):49-55.

57. Sun X, Huang LY, Pan HX, Li LJ, Wang L, Pei GQ, Wang Y, Zhang Q, Cheng HX, He CQ, Wei Q. Bone marrow mesenchymal stem cells and exercise restore motor function following spinal cord injury by activating PI3K/AKT/mTOR pathway. *Neural Regen Res.* 2023;18(5):1067-75.
58. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for Locomotion Detects Differences in Recovery after Spinal Cord Injury in Five Common Mouse Strains. *J Neurotrauma.* 2006;23(5):635-59.
59. Portney LG, Watkins MP. Validity of Measurements. In: *Foundations of Clinical Research: Applications to Practice*, 3rd ed. McGraw Hill; 2017. p. 79-110.
60. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995;12(1):1-21.
61. Borges PA, Cristante AF, Barros-Filho TEP, Natalino RJM, Santos GBD, Marcon RM. Standardization of a spinal cord lesion model and neurologic evaluation using mice. *Clinics (Sao Paulo).* 2018;73:e293.
62. Isaksson J, Farooque M, Olsson Y. Spinal cord injury in ICAM-1-deficient mice: assessment of functional and histopathological outcome. *J Neurotrauma.* 2000;17(4):333-44.

63. Bolton DA, Tse AD, Ballermann M, Misiaszek JE, Fouad K. Task specific adaptations in rat locomotion: runway versus horizontal ladder. *Behav Brain Res.* 2006;168(2):272-9.
64. Cummings BJ, Engesser-Cesar C, Cadena G, Anderson AJ. Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behav Brain Res.* 2007;177(2):232-41.
65. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol.* 1996;139(2):244-56.
66. Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Modelo experimental de lesão medular e protocolo de avaliação motora em ratos wistar. *Acta Ortop Bras.* 2011;19(2):87-91.
67. Farooque M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta Neuropathol.* 2000;100:13-22.
68. McCullagh P, Nelder JA. Generalized linear models. 2nd ed. New York, USA: Chapman and Hall; 1989.
69. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4ed ed. Illinois: McGraw-Hill Higher Education; 1996.

70. Blight AR. Cellular morphology of chronic spinal cord injury in the cat: analysis of myelinated axons by line-sampling. *Neuroscience*. 1983;10(2):521-43.
71. Blight AR, Zimmer MP. Acute spinal cord injury: pharmacotherapy and drug development perspectives. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001;2(6):801-8.
72. Koda M, Kubota S, Kadone H, Miura K, Funayama T, Takahashi H, Yamazaki M. Robotic rehabilitation therapy using Hybrid Assistive Limb (HAL) for patients with spinal cord lesions: a narrative review. *N Am Spine Soc J*. 2023;14:100209.
73. Aach M, Cruciger O, Sczesny-Kaiser M, Höffken O, Meindl RCh, Tegenthoff M, Schwenkreis P, Sankai Y, Schildhauer TA. Voluntary driven exoskeleton as a new tool for rehabilitation in chronic spinal cord injury: a pilot study. *Spine J*. 2014;14(12):2847-53.
74. Xia Y, Zhu J, Yang R, Wang H, Li Y, Fu C. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury: Mechanisms, current advances and future challenges. *Front Immunol*. 2023;14:1141601.
75. Wang X, Xuan W, Zhu ZY, Li Y, Zhu H, Zhu L, Fu DY, Yang LQ, Li PY, Yu WF. The evolving role of neuro-immune interaction in brain repair after cerebral ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther*. 2018;24(12):1100-14.

76. Li J, Zhang Q, Wang W, Lin F, Wang S, Zhao J. Mesenchymal stem cell therapy for ischemic stroke: A look into treatment mechanism and therapeutic potential. *J Neurol*. 2021;268(11):4095-107.
77. Lee S, Choi E, Cha MJ, Hwang KC. Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: a prerequisite for cell therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:632902.
78. Zhou Y, Xu H, Xu W, Wang B, Wu H, Tao Y, Zhang B, Wang M, Mao F, Yan Y, Gao S, Gu H, Zhu W, Qian H. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(2):34.
79. Zeng X, Zeng YS, Ma YH, Lu LY, Du BL, Zhang W, Li Y, Chan WY. Bone marrow mesenchymal stem cells in a three-dimensional gelatin sponge scaffold attenuate inflammation, promote angiogenesis, and reduce cavity formation in experimental spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2011;20(11-12):1881-99.
80. Takeuchi H, Natsume A, Wakabayashi T, Aoshima C, Shimato S, Ito M, Ishii J, Maeda Y, Hara M, Kim SU, Yoshida J. Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1- and HGF-dependent manner. *Neurosci Lett*. 2007;426(2):69-74.

81. An JH, Park H, Song JA, Ki KH, Yang JY, Choi HJ, Cho SW, Kim SW, Kim SY, Yoo JJ, Baek WY, Kim JE, Choi SJ, Oh W, Shin CS. Transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells or their conditioned medium prevents bone loss in ovariectomized nude mice. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(5-6):685-96.
82. Marcon RM, Cristante AF, de Barros TE Filho, Ferreira R, Dos Santos GB. Effects of ganglioside G(M1) and erythropoietin on spinal cord lesions in rats: functional and histological evaluations. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016;71(6):351-60.
83. Ung RV, Lapointe NP, Tremblay C, Larouche A, Guertin PA. Spontaneous recovery of hindlimb movement in completely spinal cord transected mice: A comparison of assessment methods and conditions. *Spinal Cord*. 2007;45(5):367-79.
84. Cheriyan T, Ryan DJ, Weinreb JH, Cheriyan J, Paul JC, Lafage V, Kirsch T, Errico TJ. Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord*. 2014;52(8):588-95.
85. Haddad AF, Burke JF, Dhall SS. The Natural History of Spinal Cord Injury. *Neurosurg Clin N Am*. 2021;32(3):315-21.
86. Cao TT, Chen H, Pang M, Xu SS, Wen HQ, Liu B, Rong LM, Li MM. Dose optimization of intrathecal administration of human umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of subacute incomplete spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2022;17(8):1785-94.

87. Torelli AG, Cristante AF, de Barros-Filho TEP, Dos Santos GB, Morena BC, Correia FF, Paschon V. Effects of ganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord injury in mice: Functional and immunohistochemical assessments. *Clinics (Sao Paulo)*. 2022;77:100006.
88. Tam KW, Wong CY, Wu KL, Lam G, Liang X, Wong WT, Li MT, Liu WY, Cai S, Shea GK, Shum DK, Chan YS. IPSC-Derived Sensory Neurons Directing Fate Commitment of Human BMSC-Derived Schwann Cells: Applications in Traumatic Neural Injuries. *Cells*. 2023;12(11):1479.
89. Albin MS, White RJ. Epidemiology, physiopathology, and experimental therapeutics of acute spinal cord injury. *Crit Care Clin*. 1987;3(3):441-52.
90. Takahashi A, Nakajima H, Kubota A, Watanabe S, Matsumine A. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cell Transplantation for Severe Spinal Cord Injury: Functional Improvement Supported by Angiogenesis and Neuroprotection. *Cells*. 2023;12(11):1470.
91. Son D, Zheng J, Kim IY, Kang PJ, Park K, Priscilla L, Hong W, Yoon BS, Park G, Yoo JE, Song G, Lee JB, You S. Human induced neural stem cells support functional recovery in spinal cord injury models. *Exp Mol Med*. 2023;55(6):1182-92.

92. Paul C, Samdani AF, Betz RR, Fischer I, Neuhuber B. Grafting of Human Bone Marrow Stromal Cells Into Spinal Cord Injury. *Spine*. 2009;34(4):328-34.
93. Liu G, Zhao Z, Wang H, Hao C, Wang W, Zhang C, Wang T, Li X, Xi J, Li S, Long H, Mi Y, Miao L, Chen Y, Xu L, Zheng L, Wang H, Ding N, Zhu F, Ge Q, Liu Y. Therapeutic Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cells With Different Delivery Route and Dosages in Rat Models of Spinal Cord Injury. *Cell Transplant*. 2022 Jan-Dec;31:9636897221139734.