

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ELISA LETTNIN KAMINSKI

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO DA MEDULA ESPINHAL**

PORTO ALEGRE, 2011

ELISA LETTNIN KAMINSKI

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO DA MEDULA ESPINHAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Asdrubal Falavigna

Porto Alegre, 2011

ELISA LETTNIN KAMINSKI

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO DA MEDULA ESPINHAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Aprovado em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof Dra Denise Machado Cantarelle – PUCRS

Prof Dr Jefferson Becker – PUCRS

Prof Dr Ricardo Viera Botelho - IAMSPEDr

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

K15t Kaminski, Elisa Lettnin

Transplante de células mononucleares da medula óssea em um modelo experimental de lesão de medula espinhal / Elisa Lettnin Kaminski. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

90 f.: gráf. tab. Inclui artigo a ser submetido para publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Coorientador: Prof. Dr. Asdrubal Falavigna

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Neurociências.

1. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO. 2. CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA. 3. TRAUMATISMOS DA MEDULA ESPINAL. 4. RATOS WISTAR. 5. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO. 6. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. 7. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Falavigna, Asdrubal. III. Título.

C.D.D. 616.853

C.D.U. 612.83-018.4:616-089.84(043.3)

N.L.M. WH 380

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Jaderson Costa da Costa, pela oportunidade que me concedeu confiando a mim esta desafiadora pesquisa e pelas inúmeras vezes em que dividiu seu vasto conhecimento comigo;

Ao meu co-orientador, Dr. Asdrubal Falavigna, que foi de fundamental importância para a realização desta pesquisa, agradeço por ter me ensinado com seu entusiasmo e paixão, pela sua dedicação, paciência e doação;

À querida amiga Gianina Venturin, agradeço pelo seu companheirismo que me acompanhou em todas as etapas do trabalho; por ter sido incansável e sempre disposta e disponível para me auxiliar;

Aos colegas e amigos Samuel Greggio e Simone de Paula, agradeço pelo apoio e por dividirem suas experiências de doutorandos comigo, e às queridas colegas de mestrado Caroline Calice e Bibiana França agradeço a oportunidade de ter aprendido tanto junto com vocês;

Agradeço a colaboração de todos os bolsistas de iniciação científica e dos funcionários do Laboratório de neurociências e sinalização celular, em especial, à bioterista Zuzete, que foi essencial no cuidado com os animais;

Ao prof Dr. Léder Xavier e à amiga Pamela Bragattini, agradeço pela colaboração na histologia e, ao colega e amigo Daniel Marinowic, pela colaboração desde o início do trabalho;

À minha amada família, pais e irmãs, agradeço por todo amor e apoio, por sempre terem me incentivado a continuar estudando e me aprimorando profissionalmente, e principalmente, pelos bons valores que souberam me ensinar, pois são estes que me fazem uma pessoa mais íntegra;

Também ao meu amado namorado Eduardo Ribeiro, agradeço por seu amor, carinho, dedicação, companheirismo e compreensão em todos os momentos de incertezas e alegrias que dividi contigo e por saber entender a distância;

Acima de tudo, agradeço a Deus, o único que, conhecendo meu mais íntimo, acompanhou-me e me proveu em todos os momentos.

RESUMO

O Trauma-raquimedular (TRM) é uma patologia que afeta drasticamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos, possui uma alta incidência e ocasiona um alto custo para o governo e a sociedade. Os tratamentos existentes para o TRM são apenas de cunho paliativo, não sendo capazes de reverter o dano neurológico ocasionado pelo trauma. Em função disso, é necessário investigar novas terapias que busquem soluções mais efetivas para esses casos. Os estudos com células-tronco de medula óssea (CTMO) têm demonstrado resultados animadores, mas ainda não definitivos para aplicação clínica; assim, a ampliação dos estudos pré-clínicos é indispensável. Para que uma pesquisa se concretize é preciso estabelecer de um modelo de lesão *in vivo*, desta forma nosso primeiro passo foi este, em seguida, buscamos, não somente, comparar o transplante de células mononucleadas da medula óssea (CMMO) com controle de veículo, como também, analisar o uso de duas vias de administração celular diferentes com janelas de tempo de transplante também distintas. A identificação da melhor via de administração para células-tronco e o tempo em que estas devem ser aplicadas também é fundamental para a prática clínica. Nossos grupos experimentais de estudo estão divididos entre vias de administração diferentes (intraparenquimatosa e subaracnóidea), com tempos de transplante de 48hs para via intraparenquimatosa ou direta, e 48hs e 9 dias para subaracnóidea ou punção lombar, bem como, dividem-se em tratados com CMMO, e seu controle de veículo (solução salina). Os animais foram avaliados quanto à função motora, através da escala de BBB, quanto à presença de CMMO na lesão, por meio de PCR, e quanto ao tamanho de lesão, através de técnica histológica. Nossos resultados demonstraram uma melhora da função motora no grupo tratado com 2 transplantes de CMMO pela via subaracnóidea e que estas células podem migrar para a lesão quando transplantadas por esta mesma via. A análise histológica revelou que o tamanho de lesão no grupo tratado com CMMO pela via direta era significativamente maior do que no grupo tratado com CMMO por punção lombar.

Palavras-chave: Modelo experimental de TRM, Células Mononucleadas da Medula Óssea, via de administração, Intraparenquimatosa, subaracnóidea.

ABSTRACT

Spinal cord injuries (SCI) cause devastating consequences for patients, and a high cost to society. Many attempts have been made to find a cure for SCI. Stem cell research has shown encouraging results, but defining the best method and time of administration remains a challenge in the clinical setting. We compared single bone marrow mononuclear cells (BMMCs) transplant by direct injection (DI) versus lumbar puncture (LP). We aimed to determine whether multiple transplants by LP may be equally or more effective than one transplant by DI. To this end, we evaluated the presence of cells after transplantation in the injured site, motor function for 3 weeks on the Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) Scale, and the size of the lesion on histology. We found that BMMCs transplanted by LP was present in the injured site, and that two transplants by this route were more effective to promote motor improvement and significant lesion size reduction than the DI.

Keywords: Experimental SCI model, Bone Marrow Mononuclear Cells, Routes of administration, intraparenchymal, subarachnoid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Procedimento cirúrgico do modelo de lesão..	27
Figura 2 – Delineamento Experimental 1.	31
Figura 3 – Delineamento Experimental 2..	32
Figura 4 – Local de avaliação motora pela escala de BBB.	33
Figura 5 – Cortes Histológicos.	39
Figura 6 - Gráfico de avaliação motora dos grupos VD.....	40
Figura 7 – Gráfico de avaliação motora dos grupos PL	41
Figura 8 – Histogramas de análise imunofenotípica.....	42
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para uma sequência específica do cromossoma Y de ratos.	43
Figura 10 – Histograma dos dados das avaliações histológicas das lesões medulares	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentagem de células da fração mononuclear da medula óssea de ratas wistar positivas para ratos.	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3hidroxi-5metil-4isoxazol ácido propiônico
BBB	Escala de Avaliação Funcional BBB.
CMMO	Células mononucleares da medula óssea.
COX 2	Ciclogenase 2
CT	Células-tronco.
CTMO	Células-tronco da medula óssea.
IL-10	Interleucina-10
LME	Lesão da Medula Espinhal.
NMDA	N-metil-D-aspartato
NASCIS	National Acute Spinal Cord Injury Studies
PCR	Reação em cadeia da polimerase.
PFA	Parafolmaldeído.
PL	Punção Lombar.
SNC	Sistema Nervoso Central.
SS	Solução Salina.
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRM	Trauma Raquimedular.
VD	Via direta.

SUMÁRIO

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
1.1TRAUMA RAQUIMEDULAR.....	11
1.1.1 Epidemiologia.....	11
1.1.2 Quadro clínico.....	12
1.1.3 Fisiopatologia.....	13
1.1.4 Tratamento.....	17
1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO MEDULAR ESPINHAL.....	18
1.3 CÉLULAS-TRONCO.....	19
1.3.1 Células tronco nas Lesões de Medula Espinhal.....	22
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1ANIMAIS.....	25
3.1.1 Aspectos éticos.....	25
3. 2 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO.....	26
3. 3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA.....	28
3. 4 CITOMETRIA DE FLUXO.....	28
3. 5 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA TRANSPLANTE.....	29
3. 6 VIAS DE ENTREGA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES.....	29
3. 7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
3. 8 AVALIAÇÃO FUNCIONAL.....	32
3. 9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	34
3. 10 DETECÇÃO POR PCR DO CROMOSSOMO Y DAS CMMO TRANSPLANTADAS.....	35
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37

4 RESULTADOS	38
4.1 EFETIVIDADE DO MODELO DE COMPRESSÃO POR CLIPE DE ANEURISMA	38
4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA (ESCALA BBB).....	39
4.3 CITOMETRIA DE FLUXO.....	41
4.4 PRESENÇA DE CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA NA REGIÃO MEDULAR LESADA APÓS OS TRANSPLANTES.....	43
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA	43
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES.....	52
PERSPECTIVAS FUTURAS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICE- A.....	60
ANEXO - A	92

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 TRAUMA RAQUIMEDULAR

1.1.1 Epidemiologia

O Trauma Raquimedular (TRM) é consequência de uma força física que supera a capacidade de proteção e sustentação da coluna vertebral e ocasiona uma compressão da medula espinhal, causando uma lesão que pode gerar comprometimento neurológico permanente. Esta patologia possui alta incidência, nos Estados Unidos, um dos países com maior incidência de TRM, pessoas acometidas somam entre 28 a 55 milhões na população (Mcdonald e Sadowsky, 2002). Mundialmente, costumava-se falar entre 15 a 40 casos por milhão (Sekhon e Fehlings, 2001), entretanto, após extensa e recente revisão da literatura, Wyndaele, M. e Wyndaele, J. (Wyndaele e Wyndaele, 2006) verificaram que a incidência mundial era superior ao previamente publicado, ficando entre 10.4 e 83 casos por milhão de habitantes. Estes mesmos autores relatam que a prevalência do TRM varia entre 223 a 755 por milhão de habitantes ao redor do mundo. No Brasil, ocorrem cerca de 40 casos novos anuais por milhão de habitantes, perfazendo um total de 6 a 8 mil casos por ano (Da Paz, Beraldo *et al.*, 1992).

As causas do TRM são variadas, sendo as mais comuns os acidentes automobilísticos (45.6%), as quedas (19.6%), a violência urbana (17.8%) e as atividades recreacionais, como esportes (16%). Na maioria dos casos acomete pessoas em idade ativa, em torno de 30 anos, sendo sua maior frequência na faixa de idade dos 15 e 25 anos. O sexo masculino é o mais acometido, sendo a proporção de quatro homens para cada mulher (Jackson, Dijkers *et al.*, 2004).

O TRM resulta em elevado custo para o governo e a sociedade, por ser de elevada incidência e normalmente afetar pessoas em idade ativa, determinando, muitas vezes, uma morbidade elevada. O custo total do tratamento de cada indivíduo está estimado entre 500.000 a 2 milhões de dólares, dependendo de fatores como a extensão e localização da lesão, pois uma lesão mais grave está diretamente correlacionada com maior disfunção e altos custos. Nos Estados Unidos, o gasto total com os pacientes de TRM excede \$7 bilhões por ano (Devivo, 1997) No Brasil, a despesa anual com esses pacientes é de, aproximadamente, trezentos milhões de reais (Leal-Filho, Borges *et al.*, 2008).

1.1.2 Quadro clínico

O nível da lesão neurológica é definido como o segmento mais caudal da medula espinhal com função normal, sensitiva e motora, de ambos os lados. Quando é utilizado o termo nível sensitivo, este se refere ao nível mais caudal da medula espinhal que apresenta sensibilidade normal, podendo, do mesmo modo, ser conceituado o nível motor. O nível raquiano da lesão é definido através de exames radiológicos.

A lesão medular é denominada completa, quando existe ausência de sensibilidade e motricidade inferior ao nível de lesão, permanecendo somente os reflexos involuntários. Na lesão incompleta, existe a preservação de, no mínimo, uma das modalidades, sensitiva ou motora, abaixo da lesão. A definição de lesão medular completa ou incompleta somente poderá ser feita quando o paciente não estiver em choque medular.

O choque medular é um sintoma neurológico transitório que ocorre abaixo do nível de impacto e pode reverter-se em minutos ou horas após uma lesão brusca, completa ou incompleta. Suas características são a paralisia completa imediata e anestesia com hipotonia e arreflexia. As respostas plantares podem estar ausentes ou serem extensoras ou inconclusivas. O estado hipotônico arreflético é gradativamente substituído por sinais piramidais, geralmente no intervalo de 3 ou 4 semanas. A evolução do estado arreflético para o hiperreflético pode ser adiada por

uma infecção urinária, pela infecção de escaras de decúbito, por anemia ou desnutrição.

A causa direta do choque neurogênico é a disfunção das vias eferentes do sistema nervoso simpático medular com consequente vasodilatação dos vasos viscerais e das extremidades, somado à perda do tônus simpático cardíaco (Alexander, 2007). O choque neurogênico se difere do hipovolêmico, pois, no primeiro, observa-se uma bradicardia e pulso arterial periférico cheio, do contrário, no segundo, existe uma taquicardia e pulso periférico filiforme.

O termo tetraplegia refere-se à perda da função motora nos membros superiores e inferiores devido a uma lesão da medula no seu segmento cervical. Não sendo incluídas nessa categoria as lesões do plexo braquial e seus ramos terminais A paraplegia refere-se à perda da função motora nos membros inferiores secundária a lesão do segmento torácico, lombar ou sacral da medula espinhal. Não sendo incluídas as lesões do plexo lombossacro e seus ramos terminais (Ditunno e Formal, 1994). A disfunção autonômica das vísceras, em especial da bexiga e intestino, está associada em ambos os casos, seja de tetraplegia ou paraplegia.

A definição da lesão medular de completa ou incompleta se refere a funcionalidade, motora e sensitiva, da medula espinhal e não a perda da continuidade anatômica. A separação física dos tratos da medula espinhal usualmente não é observada, o que não impede que o paciente esteja em lesão medular completa. A degeneração local dos axônios e sua perda de continuidade é um processo gradual, que tem início após alguns dias do traumatismo, sendo consequência de uma série de eventos patológicos relacionados à lesão da membrana celular e suas proteínas.

1.1.3 Fisiopatologia

A lesão da medula espinhal (LME) pode ser classificada, de acordo com o momento da lesão, em primária e secundária. A lesão primária decorre do trauma

mecânico inicial, o qual é seguido por uma série de eventos celulares e moleculares secundários (lesão secundária), que resultam na progressiva degeneração do tecido medular (Eftekharpour, Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2008).

A natureza do TRM envolve, na maioria dos casos, um trauma por contusão. Nas lesões contusivas da medula espinhal, os osteoligamentos (junções ósseas e ligamentos) da coluna espinhal sofrem uma variedade de forças que podem incluir flexão, extensão, força axial, rotação e distração. Essas forças transmitem o primeiro insulto mecânico à medula espinhal (Zwimpfer e Bernstein, 1990). Assim, na lesão primária, a compressão direta dos elementos neurais pelos fragmentos ósseos fraturados e deslocados, bem como pelas lesões do disco cartilaginoso e dos ligamentos, acarretam lesões tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto no periférico, portanto, vasos sanguíneos, axônios e membranas celulares são lacerados neste momento do trauma (Mcdonald e Sadowsky, 2002).

Este insulto inicial desencadeia uma série de eventos secundários, chamada de cascata de lesão secundária, os quais consistem em: rompimento vascular e isquemia, excitotoxicidade glutamatérgica, estresse celular oxidativo e inflamação, sendo que todos esses culminam com apoptose celular (Eftekharpour, Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2008).

O rompimento mecânico dos microvasos forma petéquias hemorrágicas e trombose intravascular, as quais, em combinação com o vasoespasma e o edema local, ocasionam uma hipoperfusão severa e isquemia. Como este fenômeno é primariamente microvascular, a substância cinzenta é a primeira a ser acometida, podendo estender-se para a substância branca nas 4 a 8 horas seguintes, como consequência de uma redução geral do fluxo sanguíneo no local da lesão (Tator e Koyanagi, 1997). Esta hipoperfusão diminui ou bloqueia a propagação dos potenciais de ação ao longo dos axônios, contribuindo para o choque espinhal (Mcdonald e Sadowsky, 2002).

A isquemia secundária também ocorre pela compressão do tecido medular no estojo ósseo, seja pelo edema global da medula ou sua compressão por fragmento vertebral. Independentemente da causa, a compressão sobre o tecido excede a pressão venosa, a auto-regulação do fluxo sanguíneo cessa, o choque neurogênico se desenvolve e a hipotensão sistêmica exacerba a isquemia. Esta isquemia

realizada a partir de toxinas originadas da ruptura de membranas celulares neurais e os deslocamentos eletrolíticos desencadeiam a cascata de lesão secundária (McDonald e Sadowsky, 2002).

As células gliais e os vasos sanguíneos danificados secretam radicais livres, os quais consistem em moléculas que possuem elétrons não-pareados, que são altamente reativos a lipídeos, proteínas e DNA. Os radicais livres causam progressiva oxidação dos ácidos graxos contidos na membrana celular, o que é chamado de peroxidação lipídica. O estresse oxidativo também pode desabilitar uma cadeia de enzimas mitocondriais, alterar o DNA e proteínas associadas ao DNA e inibidoras sódio-potássio ATPase. A soma desses fatores induz a subsequente necrose e apoptose de células que não haviam sido inicialmente lesionadas (Kwon, Tetzlaff *et al.*, 2004).

Em resposta à isquemia e à despolarização da membrana celular, observa-se o aumento na produção de glutamato a níveis altamente tóxicos, chamado de excitotoxicidade. A excitotoxicidade glutamatérgica provoca uma superativação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), o qual secreta altas quantidades do íon cálcio. Elevadas concentrações de cálcio no citosol e na mitocôndria acarretam múltiplos processos cálcio-dependentes que podem interromper o metabolismo celular (Choi, 1992).

A excitotoxicidade acarreta disfunção, não somente dos neurônios, como também das células de sustentação, tais como os oligodendrócitos, as células mielínicas e as gliais. A hiperexcitação de NMDA, juntamente com outros receptores de glutamato chamados AMPA (α -amino-3hidroxi-5metil-4isoxazol ácido propiônico) e kainato, ocasionam uma despolarização na membrana celular que culmina no acúmulo tóxico de íon sódio dentro das células mielínicas, gliais e oligodendrócitos (Rosenberg, Teng *et al.*, 1999). Isso pode explicar porque axônios intactos se tornam desmielinizados e incapazes de conduzir impulsos após o trauma de medula espinhal (McDonald e Sadowsky, 2002).

A inflamação é uma resposta de reparação e defesa universal dos tecidos que sofrem algum tipo de lesão. Na medula espinhal lesada, essa resposta envolve componentes celulares como neutrófilos, macrófagos e células T, bem como, componentes moleculares do tipo citosinas e prostaglandinas. Após a LME, a região

lesada é infiltrada rapidamente por neutrófilos, os quais, ao secretar enzimas líticas e citosinas, prejudicam ainda mais o tecido local e promovem o recrutamento de outras células inflamatórias (Popovich, Wei *et al.*, 1997).

Quando a microglia local é ativada, os monócitos/macrófagos são recrutados para fagocitar o tecido lesado. Estas e outras células reativas produzem citosinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas e interferom, que mediam a resposta inflamatória e amplificam o dano tecidual (Klusman e Schwab, 1997). Todavia, Bethea (Bethea, 2000) aduz que muitos estudos apontam a inflamação não somente com um efeito neurotóxico, mas também, como fonte de propriedades neuroprotetoras. O principal agente bioquímico dessa discussão é o TNF- α que, pode tanto induzir a expressão de ciclogênase-2 (COX-2), o qual potencializa os efeitos deletérios da inflamação (Resnick, Graham *et al.*, 1998), quanto induzir a expressão de outras citosinas, como a interleucina-10 (IL-10), que é considerada como tendo ação antiinflamatória, e pode induzir, inclusive, genes antiapoptóticos (Brewer, Bethea *et al.*, 1999). Esses conceitos têm reforçado a hipótese de que a fase inflamatória inicial é naturalmente danosa ao tecido nervoso, enquanto que a fase tardia da inflamação possui eventos que parecem ser protetores (Kwon, Tetzlaff *et al.*, 2004).

Todos os eventos bioquímicos da cascata de lesão secundária culminam em morte celular, seja por necrose ou apoptose. Embora ambas tenham como resultado a morte celular, seus mecanismos fisiopatológicos são distintos. Na necrose, o insulto externo à célula altera os mecanismos homeostáticos, causando um dano na membrana e nas organelas celulares, perda da produção de ATP, edema e eventual rompimento celular. Em contrapartida, na apoptose existe uma participação ativa da célula, com ativação de enzimas chamadas caspases. Estas enzimas afetam proteínas de núcleos e citoesqueleto e provocam o desmantelamento ordenado da célula (Nicholson e Thornberry, 1997). Portanto, a necrose é caracterizada por perda da produção de ATP e falha energética, enquanto a apoptose é ATP dependente e requer a síntese de novas proteínas para ocorrer (Emery, Aldana *et al.*, 1998).

A apoptose, porém, não acontece apenas durante a lesão secundária, podendo ser observada dias ou semanas após o trauma inicial e em regiões distantes do local de lesão. Isso ocorre em virtude de que uma onda de apoptoses

pode varrer, através dos oligodendrócitos, a região medular lesada, afetando seus segmentos (Beattie, Farooqui *et al.*, 2000).

1.1.4 Tratamento

As opções atuais de tratamento para a lesão da medula espinhal (LME) incluem condutas que visam conter a progressão da lesão e promover a manutenção das estruturas não danificadas. Dentre estas, destacam-se o uso de altas doses de succinato sódico de metilprednisolona, intervenções cirúrgicas para estabilizar e descomprimir a medula espinhal, o manejo intensivo da hipotensão arterial e da temperatura corporal e os cuidados de reabilitação. Entretanto, apesar de todo o esforço, essas terapias fornecem apenas benefícios modestos para os pacientes de TRM (Baptiste e Fehlings, 2007).

A administração da metilprednisolona, por exemplo, tem sido amplamente estudada em ensaios clínicos controlados e randomizados pelo NASCIS (National Acute Spinal Cord Injury Studies), como um possível agente capaz de agir na inflamação aguda, freando os efeitos deletérios da lesão secundária. Porém até hoje, sua real eficácia ainda não foi comprovada (Bracken, Shepard *et al.*, 1990; Bracken, Shepard *et al.*, 1997; Bracken, Shepard *et al.*, 1998).

Estudos pré-clínicos tem se focado em outras técnicas de tratamento, como a intervenção cirúrgica da LME aguda, tentando avaliar a função e tempo de descompressão medular, ou em técnicas de neuroproteção, como o uso da tetraciclina semi-sintética de segunda geração derivada da minociclina, que poderia auxiliar na condução axonal com os bloqueadores dos canais de potássio (Baptiste e Fehlings, 2007).

Em nenhum dos tratamentos acima citados há uma abordagem neuroregenerativa, que propicie uma substituição para as células neurais lesadas. Com isso, ainda há uma necessidade crítica para identificar novas terapias que busquem tratar ou reparar a medula espinhal disfuncional, na esperança de reverter o

dano do tecido nervoso. Estudos recentes tem apontado o transplante de células indiferenciadas e inespecializadas, ou seja, células-tronco, como uma nova opção para regeneração tecidual. Contudo, por ser esta uma opção de tratamento ainda não consolidada há necessidade do estabelecimento de um modelo experimental *in vivo* para seu estudo.

1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO MEDULAR ESPINHAL

O modelo de lesão medular ideal deve procurar aproximar-se da realidade observada em clínica. A partir de estudos de imagem e histologia pesquisadores observaram que os traumas de medula espinhal humanos, geralmente, classificavam-se em natureza contusiva, envolvendo a formação de cavidade, compressão e laceração do tecido medular (Bunge, Puckett *et al.*, 1997).

Várias espécies de animais podem ser utilizadas para investigação científica. Os ratos têm sido escolhidos para o estudo da lesão traumática da medula espinhal, não somente pela sua fácil disponibilidade, como também por apresentar características morfológicas, bioquímicas e funcionais similares as humanas (Metz, Curt *et al.*, 2000). As ratas fêmeas são indicadas para esse modelo por serem mais facilmente trabalhadas quanto à função urinária, a qual fica comprometida pela lesão (Onifer, Rabchevsky *et al.*, 2007).

A primeira experimentação animal para LME traumática foi descrita por Allen em 1911, através do modelo de peso em queda livre (weight-drop) em cães (Dohrmann e Panjabi, 1976). Mais tarde esta mesma técnica foi adaptada para ratos por Wrathall e colaboradores (Wrathall, Pettegrew *et al.*, 1985). Atualmente, foi desenvolvido um sofisticado aparelho para realizar este tipo de lesão pela Universidade de Nova Iorque (NYU Mascis Impactor) (Onifer, Rabchevsky *et al.*, 2007), o qual é mundialmente utilizado, porém possui elevado custo.

Uma excelente alternativa é o modelo de compressão por clipe de aneurisma. Este modelo foi desenvolvido primariamente por pesquisadores que consideravam o

modelo de queda de peso (*weight-drop*), desenvolvido por Allen, muito agressivo para ratos. Para solucionar este problema e aproximar-se do modelo de compressão ventral, normalmente observado na condição clínica humana, os pesquisadores pensaram em uma compressão sustentada gerada por um clipe de aneurisma (Rivlin e Tator, 1978). Este clipe possui uma força pré-determinada, sendo o tempo de compressão variável, de acordo com a força de fechamento do clipe. O modelo de lesão por compressão de clipe resulta em déficit funcional que se correlaciona com as seqüelas neurológicas observadas na prática diária, pode ser reproduzido com relativa facilidade e possui baixo custo (Von Euler, Seiger *et al.*, 1997).

1.3. CÉLULAS-TRONCO

Durante a embriogênese, um único ovócito fertilizado dá origem a um organismo multicelular, cujas células adotam formas e características diferentes para possibilitar as funções especializadas de cada órgão do corpo. Até o crescimento completo do tecido as células continuam proliferando e diferenciando-se em alta escala. Quando o órgão está formado, alguns tecidos ainda mantem um processo chamado de homeostase, onde células perdidas, seja naturalmente ou por lesão, são repostas por novas células, exemplos disto, são o fígado, a pele e o sistema hematopoiético. Esta incrível capacidade de um embrião dar origem a tecidos maduros e certos tecidos se auto-renovarem durante a vida é resultado direto das células-tronco (CT) (Fuchs e Segre, 2000).

As células-tronco são unidades imaturas e não especializadas naturais do desenvolvimento embrionário com capacidade de dividir-se, e dar origem a outra célula-tronco, por período indefinido; bem como, de diferenciarem-se em células especializadas, dadas as condições adequadas. Portanto, uma célula-tronco possui potencial para gerar células maduras com formas e funções específicas como as cardíacas, epidérmicas ou nervosas (Morrison, Shah *et al.*, 1997)

As células tronco podem ser classificadas em embrionárias e somáticas ou “adultas”. As células-tronco embrionárias são consideradas totipotentes, porque derivam do blastocisto e, por isso, têm a capacidade de originar células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma. Já as células-tronco adultas ou somáticas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados (especializados). Essas células são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (Kaji e Leiden, 2001). Tipicamente, as células-tronco geram tipos celulares intermediários antes de se diferenciar completamente. A célula intermediária é chamada célula precursora ou célula progenitora. As células precursoras nos tecidos adultos ou fetal são células parcialmente diferenciadas que se dividem e dão origem a células diferenciadas (Morrison *et al.*, 1997).

A linhagem embrionária das células-tronco ainda representa uma séria discussão em torno de seus dilemas éticos. Além disso, essas células também possuem limitações por necessitarem de indução neuronal primária ao seu transplante, em função do risco de desenvolvimento de células tumorigênicas. Somase a esses fatores, o risco de serem rejeitadas pelo organismo (Stewart, Christie *et al.*, 2003).

Em contrapartida, as células-tronco adultas autólogas, como as da medula óssea, possuem vantagens legislativas em relação às embrionárias ou fetais, pois podem ser coletadas do próprio paciente, rejeitando o uso de embriões e abolindo a possibilidade de rejeição pelo paciente. Adicionalmente, são facilmente trabalhadas em laboratório, podendo ser expandidas *in vitro* rapidamente. Além disso, não há discussão quanto a riscos para sua utilização na clínica diária, afinal, seu uso já data de várias décadas em doenças como a Leucemia (Boido, Rupa *et al.*, 2009).

As células-tronco “adultas” são melhor denominadas como somáticas por encontrarem-se na intimidade dos tecidos do corpo ou soma. Acreditava-se que estas células se diferenciariam apenas de forma unidirecional, estando, assim, comprometidas com a determinada linhagem celular de seu tecido residente, e por isto não seriam pluripotentes, a exemplo das embrionárias (De Paula, Greggio *et al.* 2010).

Esta teoria tem mudado a partir das recentes evidências, as quais revelam que as células-tronco adultas têm uma plasticidade superior ao que se imaginava. Estudos demonstram que células-tronco como as da medula óssea, além de dar origem a células progenitoras sanguíneas derivadas das CTs hematopoiéticas, também podem transdiferenciar-se em células de diferentes tecidos, ou seja, células não-hematopoiéticas, como as de ossos (Rickard, Sullivan *et al.*, 1994), cartilagens (Ashton, Allen *et al.*, 1980), músculos, fígado (Alison, Poulson *et al.*, 2000), coração (Thiele, Varus *et al.*, 2004), pulmões (Suratt, Cool *et al.*, 2003) e outros.

A existência da plasticidade cerebral é uma das descobertas mais importantes da ciência moderna. O cérebro não era tradicionalmente considerado um sistema de células-tronco, em função do dogma de que quanto sofria lesão não se regenerava. Essa afirmação caiu por terra com o resultado do estudo de Altman (Altman, 1969) em 1969, provando que algumas regiões do cérebro adulto, como a zona subventricular do ventrículo lateral e a zona subgranular no hipocampo, apresentavam neurogênese.

Este achado importantíssimo foi o estímulo necessário para o desenvolvimento de inúmeras pesquisas para o estudo da ação das células-tronco no SNC. Exemplos disto, são os estudos de Bjornson e colaboradores (Bjornson, Rietze *et al.*, 1999), demonstrando que células isoladas a partir do encéfalo de camundongos transgênicos se diferenciaram em células hematopoiéticas; bem como, os achados de Mezey e colaboradores (Mezey, Chandross *et al.*, 2000), os quais comprovaram que células da medula óssea diferenciaram-se em células que expressaram marcadores neuronais.

Além de expressar marcadores, estudos demonstram melhora da função motora após transplante de células-tronco de medula óssea (CTMO) em modelos animais de doenças do SNC. Alguns estudos evidenciaram este achado através do uso da eletrofisiologia (Jiang, Henderson *et al.*, 2003). Dentre os modelos animais em que foram utilizadas as CTMO, destacam-se os de doenças como: Parkinson (Li, Chen *et al.*, 2001), Huntington (Lescaudron, Unni *et al.*, 2003), isquemia cerebral (Chen, Li *et al.*, 2001) e síndrome hipóxico-isquêmica (De Paula, Vitola *et al.*, 2009).

1.3.1 Células tronco nas Lesões de Medula Espinhal

Uma das patologias neurológicas amplamente exploradas no âmbito da regeneração a partir de células-tronco é o trauma raquimedular, o qual já foi estudado em variados modelos de lesão medular experimental. Chopp e colaboradores (Chopp, Zhang *et al.*, 2000), por exemplo, demonstraram que o transplante intraparenquimatoso de CTMO no modelo traumático de LME, resulta em melhora na marcha de ratos, submetidos à lesão, e ainda, que estas células migraram para a região dorsal e ventral da lesão e se diferenciaram em neurônios e oligodendrócitos. Achados similares foram relatados por Hofstetter e colaboradores (Hofstetter, Schwarz *et al.*, 2002).

Outro estudo mostrou que as CTMO em co-cultura com células-tronco neurais, obtidas da medula espinhal de ratos, propiciavam a diferenciação dessas células-tronco neurais em neurônios e células gliais *in vitro*. O estudo *in vivo* demonstrou que o transplante, logo após o trauma, das CTMOs reduziu a formação de cavidade lesional, bem como, melhorou a função motora (Wu, Suzuki *et al.*, 2003).

Ohta e colaboradores (Ohta, Suzuki *et al.*, 2004), observaram uma melhora da função motora dos ratos e uma integração local das CTMOs transplantadas, independente do intervalo de tempo administrado, 4 a 35 dias, após a lesão. Porém, não foi observado uma diferenciação das células, o que levou os autores a concluir que, a melhora funcional e histológica, não seriam resultado da reposição celular, mas sim da secreção de fatores tróficos que induzem a proliferação e o crescimento de células-tronco endógenas. Essa mesma linha de pensamento também foi reforçada por vários outros estudos, nos quais se observava melhora na marcha dos animais após o transplante de CTMO na LME, mesmo sem detecção de diferenciação dessas células. Um exemplo disso foi o estudo de Koda e col. um ano mais tarde (Koda, Okada *et al.*, 2005). Assim, essa vertente sugere que as CTMO quando transplantadas em uma lesão criam um ambiente mais favorável, limitando o dano e promovendo regeneração via: imunossupressão (Aggarwal e Pittenger, 2005; Noel, Djouad *et al.*, 2007), expressão de fatores tróficos e citocinas (Song, Kamath *et al.*, 2004), reorganização vascular,

promoção de substratos de crescimento e supressão da formação de cavidade lesional (Hofstetter, Schwarz *et al.*, 2002).

Conforme exposto conclusões definitivas sobre a capacidade de regeneração das CTMO na medula espinhal lesada ainda não são possíveis. Os resultados, até o momento, ora são animadores, ora controversos. Sendo assim, são necessários mais estudos pré-clínicos, a fim de que se possa assegurar a eficácia e a viabilidade desta terapia (Coutts e Keirstead, 2008).

Além disso, muitas variáveis ainda precisam ser esclarecidas, como o tipo de células-tronco que proporcionam melhor eficácia, o número de células a ser aplicado, a melhor via de administração (Schultz, 2005; Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008) e o intervalo de uso mais apropriado para sua administração (Rowland, Hawryluk *et al.*, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a aplicação de células mononucleares de medula óssea utilizando duas vias de administração, a intraparenquimatosa e a subaracnóidea, com janelas terapêuticas distintas, no modelo experimental de lesão de medula espinhal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Verificar a efetividade de um modelo experimental de lesão da medula espinhal para estudo de potencial terapêutico de células-tronco de medula óssea, utilizando duas vias de administração, a intraparenquimatosa e a subaracnóidea, com diferentes tempos de administração;
- 2- Verificar após o transplante a presença de células mononucleares da medula óssea na região medular lesada;
- 3- Avaliar a função motora entre os animais *sham* e aqueles submetidos a LME, entre os diferentes grupos tratados e seus controles e, finalmente, entre os tratados por vias de administração e janelas terapêuticas distintas;
- 4- Avaliar histologicamente a extensão da lesão medular entre os diferentes grupos estudados.

3 MATERIAL E METODOS

3.1 ANIMAIS

Durante este estudo foram utilizadas 70 ratas fêmeas da raça Wistar, com 60 dias de idade e peso de aproximadamente 250 g para a realização da lesão medular e o tratamento com CMMO. Para a doação de CMMO foram utilizados 15 ratos machos, os quais possuíam origem e características semelhantes aos das ratas. Todos os animais eram provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante os experimentos as ratas foram mantidas no vivário do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob iluminação e temperatura controladas (ciclo claro-escuro 12 h; temperatura em torno de 24^o C), e receberam ração e água *ad libitum*.

3.1.1 Aspectos éticos

Os protocolos experimentais utilizados nesta pesquisa seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório. O estudo teve início apenas após os protocolos terem sido submetidos para avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEUA 09/00109). Todos os procedimentos foram realizados tomando-se os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e seu sofrimento.

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO

Após ampla revisão de literatura e alguns experimentos práticos foi escolhido o modelo de lesão medular por compressão com clipe de aneurisma. Este modelo foi escolhido em função da semelhança de seu mecanismo de lesão com a realidade dos traumas clínicos e também por ser de fácil reprodução (Rivlin e Tator, 1978).

As ratas foram pesadas e posteriormente anestesiadas, pela via intraperitoneal, com xilasina na dose de 0,1 ml/g e quetamina na dose de 0,22 ml/g. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral com as patas fixadas e o dorso tricotomizado. A assepsia do dorso foi feita com povidine aquoso.

Para inferir o local de incisão foi realizada a palpação da última costela do animal, seguida de uma incisão de 3 cm na região dorsal média com afastamento da musculatura paravertebral, a fim de, permitir a visualização da última costela. A laminectomia da oitava vértebra torácica (T8) foi realizada após ter seu nível definido pela contagem das costelas, no sentido caudal-cranial, a partir da última costela. As lâminas de T8 foram retiradas cuidadosamente, sob magnificação, a partir de então, o saco dural pôde ser identificado. Nesse momento a lesão medular era feita através da colocação das hastes do clipe (Vicca) abertas, em cada lado da medula espinhal, e posterior fechamento dessas hastes, mantendo-se uma pressão de 50 g/força durante o tempo cronometrado de 60 segundos. Após a lesão, a incisão era fechada em dois planos, o muscular e o cutâneo, através de suturas simples com o fio mononylon 3-0. Nova assepsia era feita no local da incisão após seu fechamento (Figura 1).

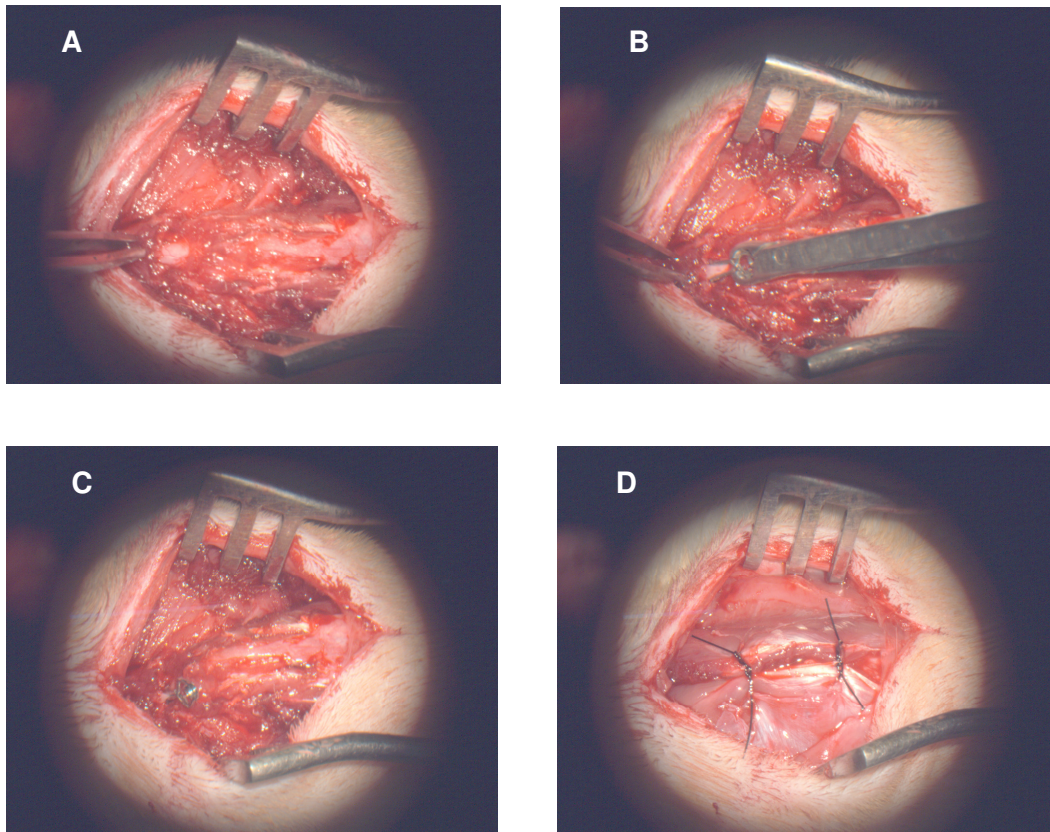


Figura 1 - Procedimento cirúrgico do modelo de lesão. A, exposição da medula espinhal, B, colocação das hastas abertas do clipe, C, fechamento das hastas e compressão da medula espinhal, D, sutura do primeiro plano, musculatura paravertebral.

Durante todo o procedimento e após a recuperação completa da anestesia, os animais foram mantidos aquecidos por lâmpadas. No término da cirurgia, eram administradas: ceftriaxona na dose 100 mg/kg por via intraperitoneal, analgesia subcutânea com tramadol na dose de 1,5 mg/kg e hidratação subcutânea com 10 ml de soro fisiológico 0,9%. A manobra de Credê era realizada ao final do procedimento para esvaziamento vesical. Os animais eram devolvidos ao vivário após sua recuperação anestésica (Liu, An *et al.*, 2004; Santos-Benito, Munoz-Quiles *et al.*, 2006).

Como consequência da lesão medular, os animais ficaram incapazes de deambular e com perda do controle esfíncteriano anal e, principalmente, vesical. Para evitar complicações pós-operatórias, foram adotados cuidados básicos fundamentais, tais como: manobra de Crede 2 vezes ao dia; inspeção diária da pele; forragem completa do fundo da caixa, para evitar úlceras de pressão, e restrição hídrica no período agudo e noturno, para diminuir a distensão vesical. As ratas eram

pesadas uma vez por semana e a ração diária reduzida para 20 g, a fim de evitar sobrepeso. Na presença de inapetência, eram administrados 10 ml de soro glicofisiológico por via intraperitoneal (Liu, An *et al.*, 2004; Santos-Benito, Munoz-Quiles *et al.*, 2006).

Na presença de infecção urinária, manifestada através de sangramento vesical e urina turva ou purulenta, era prescrito antibiótico do tipo amoxicilina com clavulinato, na dose de 2 mg/100 g, por via intraperitoneal em intervalos de 12/12 h até que a infecção fosse controlada (Liu, An *et al.*, 2004; Santos-Benito, Munoz-Quiles *et al.*, 2006).

3.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA

Para a obtenção das células mononucleares da medula óssea (CMMO), foram utilizados ratos machos como doadores, afim de que fosse possível identificar o cromossoma Y como marcador, após o transplante. Primeiramente, os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina. Após os mesmos foram dissecados, isolaram-se os ossos longos (úmero, fêmur e tíbia). As epífises desses ossos foram cortadas, possibilitando a lavagem de suas cavidades. O aspirado de medula óssea coletado foi então processado entre etapas de suspensão e centrifugação. As CMMO foram separadas por gradiente de Histopaque®-1119 e contadas em câmara de Neubauer.

3.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliação dos antígenos de superfície, amostras de três extrações da fração mononuclear da medula óssea dos ratos Wistar foram utilizadas para compor

um *pool* celular. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com anticorpo específico conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Os anticorpos utilizados foram anti CD3, CD45, CD49 e CD90 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). As amostras foram lavadas com DBPS para remoção do excesso de anticorpos e fixadas com paraformaldeído a 3,6%. A detecção das células marcadas com FITC foi realizada através do citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) equipado com laser argônio de 488 nm, utilizando o software CellQuest. Para cada avaliação foram coletados 50.000 eventos.

3.5 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA TRANSPLANTE

Foram definidas alíquotas de células mononucleares para infusão no espaço subaracnóideo ou diretamente dentro do parênquima, diferenciando-se no volume de infusão e no número de células. A alíquota para infusão no espaço subaracnóideo teve um volume de 40 µL contendo 10^6 células mononucleares, as quais foram administradas por punção lombar. A alíquota para infusão intraparenquimatosa, teve um volume de 30 µL contendo 150 mil células mononucleares, sendo transplantadas no local da lesão com agulha fina (Paul, Samdani *et al.*, 2009). A diferença entre os volumes injetados se justifica, em função da distância do tráfego celular no organismo do animal.

3.6 VIAS DE ENTREGA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

As células foram administradas através das vias subaracnóidea e intraparenquimatosa, para determinar em qual delas as CMMO chegariam à região lesada, diminuiriam o volume de lesão e propiciariam melhor recuperação funcional. Para o transplante das células mononucleares, os animais foram novamente

anestesiados com xilasina a 2% e quetamina a 10% e receberam cuidados, como aquecimento e analgesia subcutânea com tramadol.

A infusão das células no espaço subaracnóideo foi feita por punção lombar (PL). A técnica utilizada foi a palpação dos espaços interespinhais lombares, identificação dos processos espinhosos de L6 e S2 e introdução de uma agulha 27g no espaço subaracnóideo entre estes níveis. Durante o procedimento era realizada uma flexão do corpo do animal, para facilitar o acesso ao canal vertebral. A confirmação do seu posicionamento no espaço subaracnóideo foi determinada pela contratura da cauda no momento da introdução da agulha. A infusão das células foi realizada durante 1 minuto. Uma vez terminado sua infusão, a seringa foi mantida por mais 1 minuto, a fim de evitar o refluxo do líquido injetado. Passado este tempo a agulha era retirada.

A administração das CMMO no local da lesão, pela via intraparenquimatosa, foi efetuada após a reabertura dos planos musculares paravertebrais, visualização sob magnificação da medula espinhal e infusão das células com agulha de 33 g; sendo que as células foram infundidas diretamente na local da lesão. O tempo de infusão foi de 40 segundos. Após a infusão, procedeu-se o seu fechamento, com nova sutura da musculatura e pele.

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi realizado inicialmente com 30 ratas, divididas em 5 grupos de 6 animais. O grupo *sham*, tinha o objetivo de proporcionar um controle para validar o procedimento cirúrgico. As ratas dos 4 grupos restantes foram submetidas à lesão medular. No primeiro grupo (G1), as células mononucleares foram transplantadas no parênquima medular 48 h após a lesão medular. O segundo grupo foi o controle deste primeiro (G2c), no qual os procedimentos foram os mesmos, exceto pelo fato de que, foi transplantado solução salina (SS). No terceiro grupo (G3), as células transplantadas foram administradas no espaço subaracnóideo no intervalo de 48 h e

9 dias após a lesão medular. O quarto grupo foi o controle do terceiro (G4c), no qual foi infundido, no espaço subaracnóideo, duas aplicações de SS, também depois de transcorridas 48 h e 9 dias após a lesão.

Foi feita uma única administração de CMMO pela via direta (VD), pois, segundo a literatura, esta é a via mais efetiva para entrega das células transplantadas, entretanto, a via subaracnóidea é clinicamente mais viável (Paul, Samdani *et al.*, 2009).

O dano à medula espinhal normalmente ocorre durante as primeiras horas após o trauma. Respostas inflamatórias de glia, por exemplo, iniciam de 5 a 20 minutos posteriores ao traumatismo e finalizam cerca de 2 a 3 semanas após este (Stichel e Muller, 1998; Mcdonald e Sadowsky, 2002). No intuito de conter estes eventos prejudiciais, o primeiro transplante de células foi realizado 48hs após lesão. Antes desse período não seria possível, sob o ponto de vista clínico, visto que é necessário tempo para coletar e preparar as CMMO.

A função motora dos animais foi avaliada semanalmente durante o período de 21 dias após a lesão medular. Passado esse período, os animais foram eutanasiados, com uma *overdose* de anestésicos de quetamina e xilazina, utilizando a via peritoneal. A medula espinhal foi removida, e processada para estudo histológico do local da lesão.

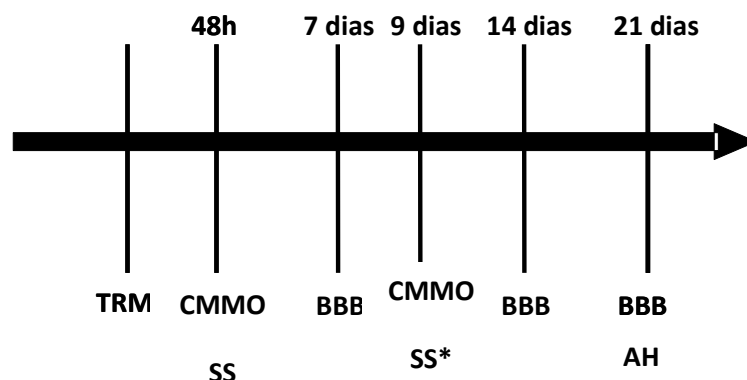


Figura 2 – Delineamento experimental 1. TRM: Trauma Raquimedular, CMMO: Células Mononucleares da Medula Óssea, SS: Solução Salina, BBB: Escala de avaliação funcional BBB, AH: perfusão para Avaliação Histológica.

* 9 dias após a lesão serão transplantadas novamente CMMO e SS nos grupos de via subaracnóidea por punção lombar.

Inicialmente, todas as ratas que possuíam seqüelas motoras após a cirurgia foram incluídas no estudo. Apenas os animais que se encontravam em mal estado geral foram excluídos. Entretanto, uma vez analisados os dados da avaliação funcional, percebemos que os animais apresentavam uma disfunção motora variada. Devido a isto se resolveu excluir os animais com comprometimento motor moderado ou leve, permanecendo no estudo apenas os graves. Para isto, foi necessário, repetir o delineamento com 13 ratas acrescentando uma avaliação 24 h após cirurgia, para excluir (antes de qualquer transplante) os animais com escores acima de 3 na escala BBB, a qual será descrita a seguir. O delineamento final está expresso na figura 3.

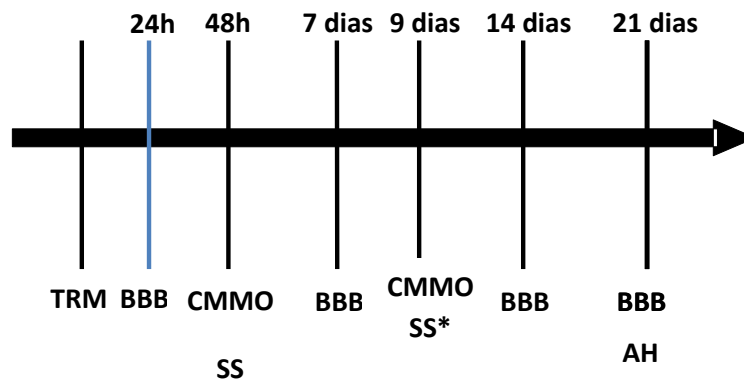


Figura 3 – Delineamento experimental 2. TRM: Trauma Raquimedular, CMMO: Células-tronco de Medula Óssea, SS: Solução Salina, BBB: Escala de avaliação funcional BBB, AH: perfusão para Avaliação Histológica. Linha azul representativa da avaliação adicionada para inclusão dos animais.

* 9 dias após a lesão serão transplantadas novamente CMMO e SS nos grupos de via subaracnóidea por punção lombar.

3.8 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

A função motora dos animais foi avaliada semanalmente através da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (Basso, Beattie *et al.*, 1995) (escala BBB, Anexo 1), desde o momento da lesão até 21 dias após. A escala BBB gradua os movimentos das articulações do quadril, joelho e tornozelo, posição do tronco, rabo e patas

traseiras. A partir de observações da movimentação do animal, são atribuídos pontos de zero a 21, sendo que o valor de zero, corresponde à ausência total de movimentos, e 21 à presença de movimento normal. Os valores de zero a 7 avaliam os movimentos primários das articulações do quadril, joelho e tornozelo; os de 8 a 13 analisam a colocação e a coordenação das patas traseiras e finalmente, pontuações de 14 a 21 pontos definem o grau da estabilidade de tronco, a posição da cauda e a colocação das patas. Os animais foram filmados para maior confiabilidade, pois a escala apresenta um número elevado de escores e a diferença dos movimentos, entre as ratas, muitas vezes era sutil (Barros Filho e Molina, 2008). As filmagens foram analisadas por dois avaliadores sem conhecimento do grupo a ser avaliado, ou seja, sem conhecimento do tratamento aplicado. No caso de diferenças ou dúvidas do valor do BBB entre os avaliadores, as filmagens eram revisadas, sendo definido seu valor final.



Figura 4 - Local de avaliação motora pela escala de B.B.B. Câmeras posicionadas de ambos os lados da caixa e o aparelho de DVD para gravação das imagens.

3.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Finalizados os 21 dias de observação funcional, os animais foram novamente anestesiados com doses elevadas de xilazina e quetamina pela via intraperitoneal. As 30 ratas destinadas a análise histológica foram perfundidas transcardialmente com solução salina seguida de paraformaldeído a 4% (PFA) diluído em tampão fosfato (PB). A coluna vertebral foi cuidadosamente dissecada e a medula espinhal removida e colocada em recipientes com PFA durante 24 h. No dia seguinte as medulas foram colocadas em sacarose 30% para desidratação da peça por mais 24h. A seguir as medula espinhais foram congeladas em isopentano, previamente resfriado em nitrogênio líquido, ambientadas em criostato a -20°C e seccionadas a 30 μm de espessura. Todas as lâminas foram processadas para a técnica histológica de Nissl. As imagens destas secções foram obtidas em lupa estereoscópica (Zeiss), acoplada a câmera CCD (PIXERA) e analisadas no software Image Pro Plus 6.1. As imagens foram analisadas em intervalos eqüidistantes de 150 micrometros, ao longo de 1cm, sendo que a lesão medular localizava-se na região mediana desta peça.

Aproximadamente 66 secções foram analisadas por medula espinhal. Estas foram analisadas em intervalos de 150 μm , e classificadas em lesionadas ou intactas. As secções que não apresentavam definições anatômicas claras entre substância cinzenta e branca, e por tanto, um aspecto “reticular” foram consideradas lesionadas. Por outro lado, foram classificadas intactas as secções que apresentavam claramente as delimitações entre as substâncias e não possuíam qualquer sinal de lesão. O número de secções foi utilizado para estimar o comprimento de lesão como uma adaptação do protocolo previamente publicado por Rousset e colaboradores (Rousset, Kassem *et al.*, 2008).

3.10 DETECÇÃO DAS CMMOs POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO DE UMA PARTE DE UM GENE DO CROMOSSOMA Y PELA TÉCNICA DE PCR

Como a presença do cromossomo Y serve de indicativo de célula-tronco transplantada do animal doador (doador = macho, receptora = fêmea) e não de células residentes do animal receptor, utilizamos iniciadores (*primers*) complementares à seqüência de DNA correspondente a uma região específica do cromossomo Y. Foram avaliadas amostras de dois grupos tratados com CMMO por ambas as vias.

Assim, 6 ratas foram submetidas ao modelo de lesão, destas 3 receberam transplante de CMMO por VD 48h após lesão, e as outras 3, receberam os dois transplantes de CMMO 48h e 9 dias após lesão por PL. 24h após o último transplante de cada grupo, as ratas foram eutanasiadas. Os animais foram previamente anestesiados com *overdose* de quetamina e xilazina e então tiveram suas colunas vertebrais dissecadas, para posterior remoção das medulas espinhais. As amostras foram brevemente reservadas em freezer a -20° C até o início do preparo das reações para a PCR.

Para a extração de DNA, os tecidos foram homogeneizados em 300 µL de tampão fosfato. A seguir, foram adicionados 600 µL de Trizol (Invitrogen). Os tubos foram agitados com auxílio de um vórtex por dois minutos e então foram adicionados 120 µL de clorofórmio (Merk) gelado. As amostras foram centrifugadas em 20.800 g por 10 minutos. Logo depois, o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 300 µL de isopropanol (Merk) gelado, e estes foram agitados por aproximadamente 2 minutos. Os tubos contendo precipitado foram descartados. Procedeu-se com nova centrifugação em 20.800 g, por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado por aspiração. Por fim, o DNA foi dissolvido em 50 µL de água ultra-pura. Os frascos contendo as amostras de DNA foram armazenados em freezer a -20°C. Previamente à reação de PCR, o DNA das amostras foi quantificado por espectofotometria.

Para avaliação da migração e presença das células mononucleares transplantadas na região lesada da medula espinhal, utilizamos a técnica da

Polymerase Chain Reaction (PCR) através da análise por eletroforese em gel de agarose. (Gibbs, 1990).

A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-200/MJ Research) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direto 5'-atggagaattctgaggaggaga-3' e reverso 5'attcacaagctgacctccagttg-3' complementares à seqüência de DNA correspondente a uma região específica do cromossomo Y, gerando um produto de PCR de 524 pb, e uma nova amplificação utilizando o *primer* direto 5'-cagagcccagtgctctgctg-3' e reverso 5'-ctcctccatttagatctgcgttc-3' gerando um produto de PCR de 324 pb, caracterizando a técnica de Nested-PCR

Para cada reação, foram utilizados 5 µg de DNA genômico, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 50 pmol de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 5 µL de solução tampão e água ultra-pura estéril para completar o volume de reação de 50 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos para desnaturação; 30 ciclos subsequentes consistindo cada ciclo de uma etapa de desnaturação a 95°C por 30 segundos, uma etapa de anelamento a 52°C por 30 segundos e uma etapa a 72°C por 1 minutos para extensão; e então uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos gerados após a técnica de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio em tampão TRIS, ácido acético, EDTA (TAE) 1x por 30 minutos aplicando uma voltagem de 100 v e uma amperagem de 400 mA. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta (3UV-Biorad) e as imagens foram capturadas utilizando equipamento de foto documentação através do programa Quantity One (Biorad).

Para o controle da reação, foram ensaiados, juntamente com cada bateria de DNA de amostras de animais transplantados, um controle positivo de reação que consistia de DNA extraído a partir de CMMO obtidas de ratos machos, e um controle negativo de reação, com omissão de qualquer DNA, além de amostras de animais que não receberam CMMO.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados obtidos no teste de B.B.B. utilizou-se a análise de variância de duas vias com medidas repetidas (ANOVA) seguida de teste de Bonferroni. Enquanto que para histologia foi utilizado análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey, para comparar os tratamentos e Teste t de Student para avaliar a diferença entre as duas vias. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do *software* estatístico *GraphPad Prism 4*.

4 RESULTADOS

4.1 EFETIVIDADE DO MODELO DE COMPRESSÃO POR CLIPE DE ANEURISMA.

Nos animais em que foi feita a compressão, todos apresentavam déficit motor, evidenciando que o modelo de lesão por compressão com clipe de aneurisma, realmente, foi efetivo para reproduzir as seqüelas motoras de uma lesão raquimedular. O modelo também demonstrou ser de fácil aprendizagem, o tempo médio de cirurgia nos primeiros animais operados era de 45 a 60 min, nos últimos, este tempo reduziu para 20 a 30 min. Além disso, o procedimento mostrou-se preciso no que diz respeito ao nível de lesão, pois este pôde ser assegurado pela contagem das costelas.

Para garantir a eficiência do modelo experimental de lesão raquimedular foi adicionado à pesquisa um grupo *sham*. Nos gráficos dos resultados motores de BBB (figuras 6 e 7) pode-se perceber que a performance motora dos animais sham é significativamente melhor que a dos demais. O grupo *sham* apresentou escore 21 (máximo) desde o início dos testes, enquanto os animais operados pontuaram no máximo sete, ao longo de todo delineamento. Sendo assim, percebe-se que o procedimento cirúrgico em si não afeta a função motora, mas sim a clipagem da medula espinhal. Os resultados histológicos (figuras 5 e 10) demonstram que não há lesão da medula espinhal no grupo *sham*, entretanto, nos grupos operados há uma desorganização tecidual no nível da lesão, e o volume de tecido sem identificação anatômica (lesão) é significativamente maior. Estes dados evidenciam que os déficits motores e a alteração na anatomia da medula espinhal ocorreram apenas nos grupos submetidos ao modelo, o que comprova a efetividade do mesmo.

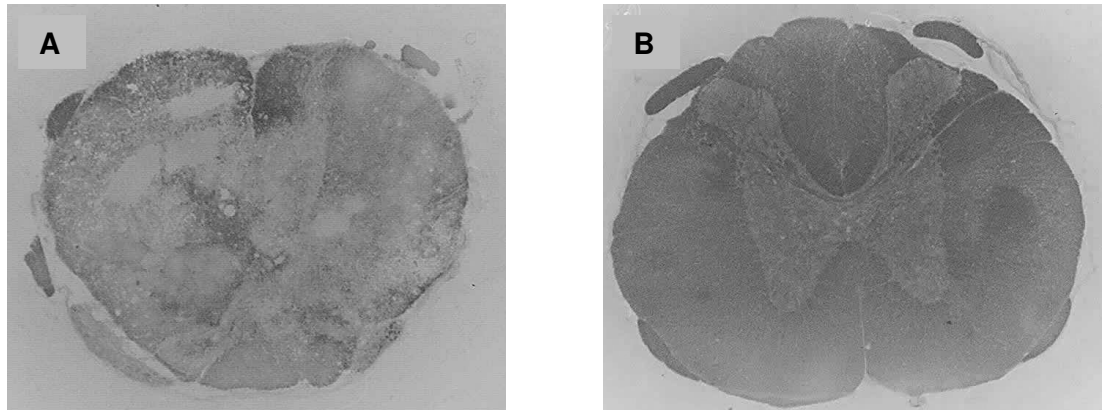


Figura 5 - Cortes histológicos. A, corte histológico de uma medula espinhal lesionada de um grupo operado. B, corte histológico de uma medula espinhal intacta do grupo Sham.

4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA (ESCALA BBB).

Os grupos transplantados com CMMO pela via direta ou intraparenquimatosa (G1) não demonstram diferenças nos escores motores ao longo das três semanas de seguimento, se comparados com o grupo controle que recebeu SS (G2c) (figura 6).

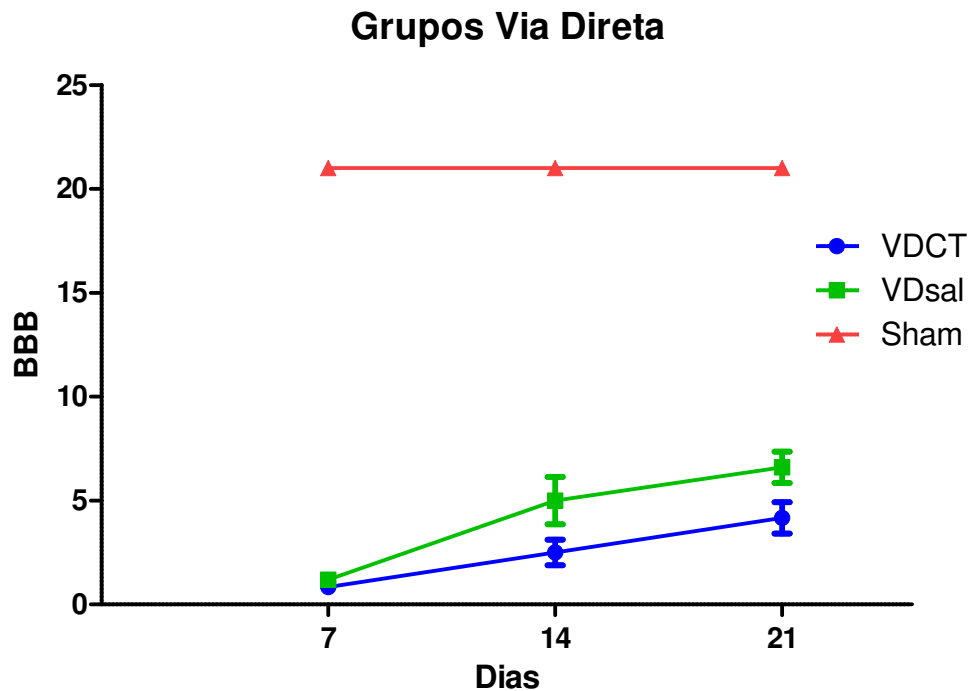


Figura - 6: Gráfico de avaliação motora dos grupos VD. O tratamento com CMMO por via intraparenquimatosa (VDCT) não melhora o desempenho motor de ratas com lesão de medula espinhal. O gráfico expressa os escores médios em três momentos (7, 14 e 21 dias) de avaliação motora pela escala de BBB, subsequentes ao modelo de lesão medular e ao transplante de CMMO ou injeção de solução salina pela via direta (VDsal) no local da lesão. Os dados estão expressos como a média \pm EP de cada dia de observação. Teste de Bonferroni após ANOVA de duas vias com medidas repetidas, $n=6$ por grupo.

Todavia, na figura 7 percebe-se que os grupos tratados com duas infusões de CMMO por via subaracnóidea (G3) demonstraram melhora motora, significativa, se comparados com o grupo controle (G4c) que recebeu SS. Nas ratas em que se transplantaram as CMMO no espaço subaracnóideo, utilizando a punção lombar, o desempenho motor melhorou a partir da segunda semana de observação motora. Embora não haja diferença estatística entre os grupos tratados com CMMO por PL ou VD é notável que o desempenho motor é melhor nos animais em que foram infundidas CT por PL.

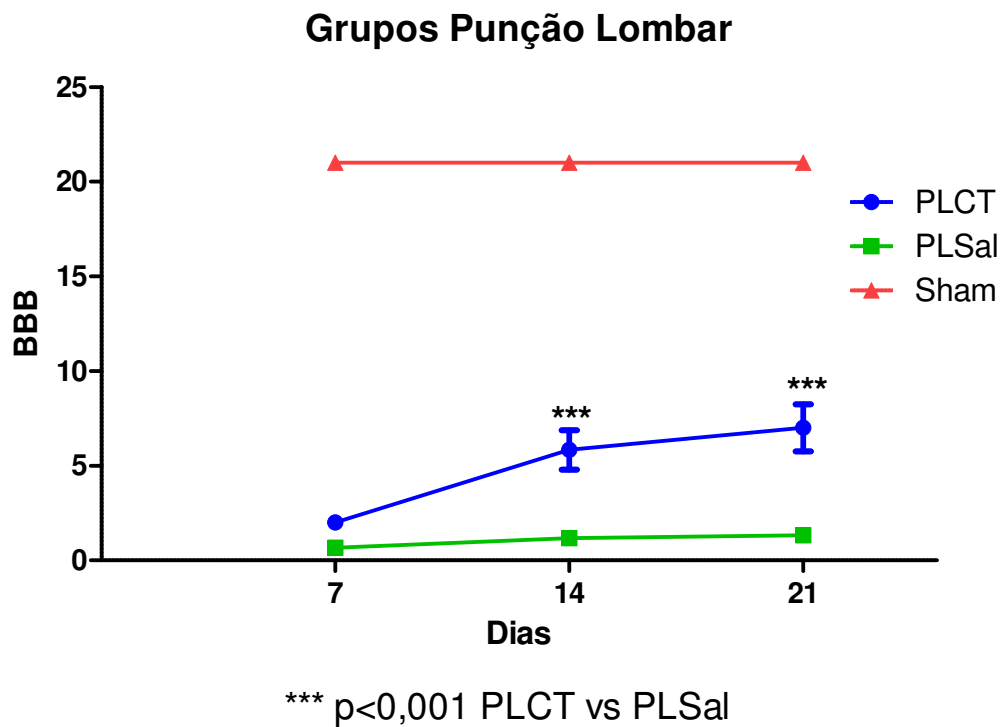


Figura – 7: Gráfico de avaliação motora dos grupos PL. O tratamento com duas infusões de CMMO por via subaracnóidea melhora o desempenho motor de ratas com lesão de medula espinhal. O gráfico expressa os escores médios em três momentos (7, 14 e 21 dias) de avaliação motora pela escala de BBB, subsequentes ao modelo de lesão medular e aos dois transplantes de CMMO (PLCT) ou injeção de solução salina por punção lombar (PLSal). Os dados estão expressos como a média \pm EP de cada dia de observação. Teste de Bonferroni após ANOVA de duas vias com medidas repetidas, $n=6$ por grupo.

4.3 CITOMETRIA DE FLUXO

Os quatro marcadores de superfície testados através da citometria de fluxo apresentaram positividade para CD90 (células-tronco hematopoiéticas e células precursoras mielóides) e CD45 (células precursoras de linfócitos B na medula óssea). Foram negativas as marcações para CD3 (linfócitos T periféricos e células dendríticas epidérmicas) e CD49 (linfócitos B e T periféricos); (Figura 8). A representação da porcentagem da marcação dos antígenos de superfície está descrita na tabela 1.

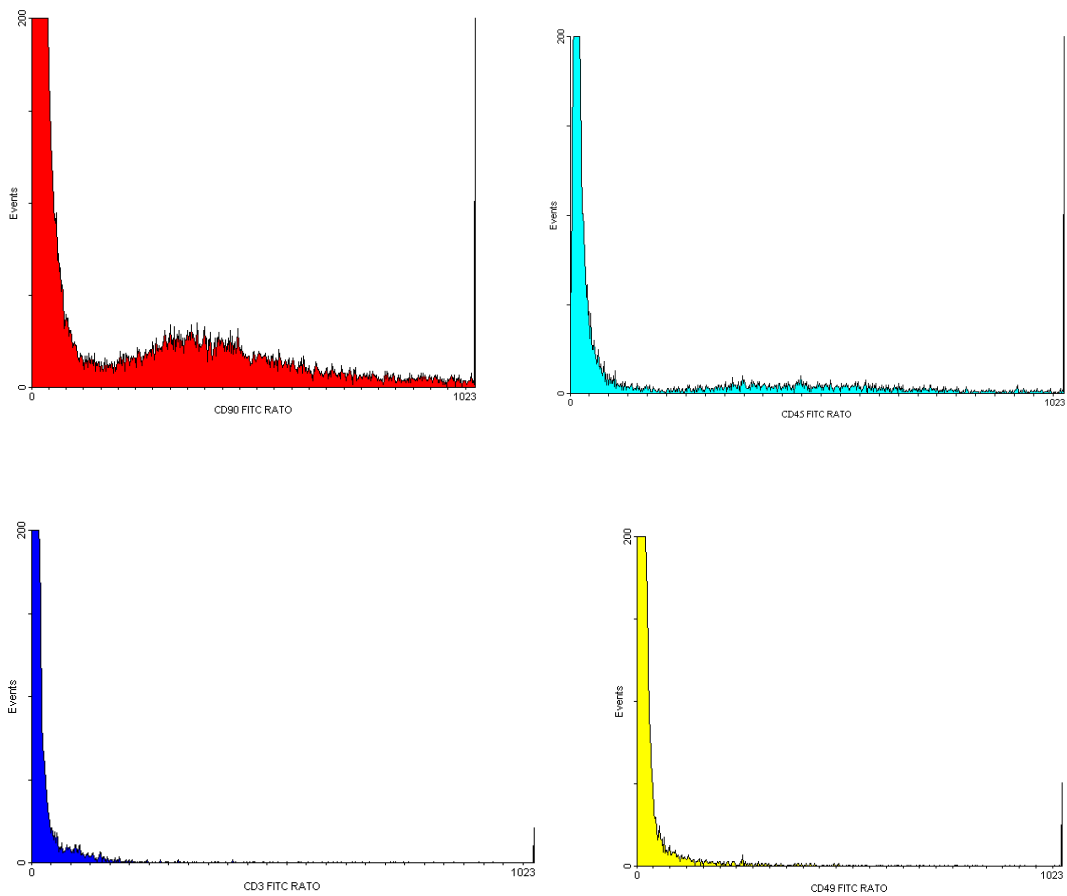


Figura – 8: Histogramas de análise imunofenotípica. Marcadores de superfície expressos na fração mononuclear da medula óssea de ratos Wistar. A análise imunofenotípica foi realizada com anticorpos anti CD90, CD45, CD3 e CD49. Os histogramas representam a intensidade de fluorescência (eixo-X) em relação ao número de células (eixo-Y). As células analisadas foram positivas para CD90 e CD 45 e negativas para CD49 e CD3.

Tabela 1: Percentagem de células da fração mononuclear da medula óssea de ratos wistar positivas para marcadores de superfície.

Marcador	CTMM (%)
CD 90	24,98
CD45	12,36
CD49	2,51
CD3	1,78

A tabela representa o percentual de marcação dos antígenos de superfície analisados através de citometria de fluxo.

4.4 PRESENÇA DE CMMOs NA REGIÃO MEDULAR LESADA APÓS TRANSPLANTES.

Das seis amostras analisadas para presença de CMMO pela técnica de PCR, uma apresentou positividade para a banda de 342 pb, referente a seqüência específica do cromossomo Y, após a segunda amplificação do ensaio Nested-PCR. A amostra positiva corresponde a de uma rata transplantada por punção lombar nos dois momentos pós-lesão, 48hs e 9 dias (figura 9).

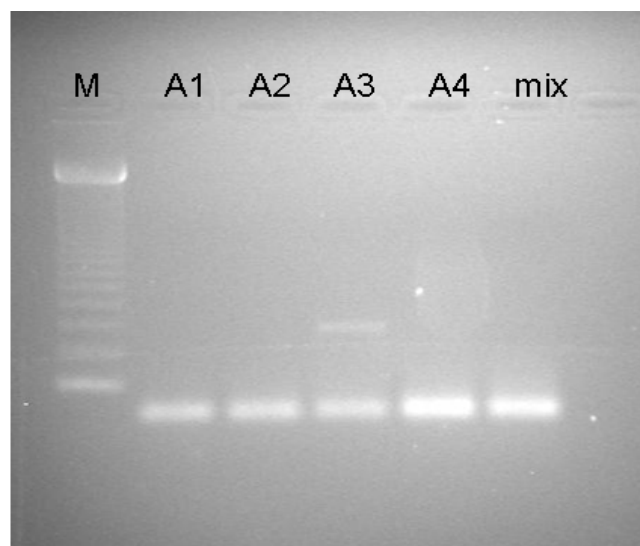


Figura - 9: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para uma seqüência específica do cromossoma Y de ratos. M: marcador de peso molecular (100 pb); A1e A2: ratas transplantadas por VD 48h pós lesão (negativo); A3: rata transplantada por PL 48 h e 9 dias pós lesão (positivo); A4: rata transplantada por PL 48h e 9 dias pós lesão (negativo); mix: controle da reação (sem DNA).

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na avaliação histológica identificamos a extensão da lesão medular, sem distinção entre substância cinzenta e branca, para verificar se o transplante de CMMO seria capaz de cicatrizar ou reorganizar o emaranhado tecidual causado pela compressão do clipe. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados

com CMMO e seus controles (animais que receberam SS). Os resultados da análise estatística dos dados histológicos foram significativos entre os animais do grupo sham e os demais (operados), evidenciando que no grupo sham a medula espinhal estava íntegra (figura 10, A e B). Embora não se tenha observado diferenças estatísticas entre os grupos de infusão, foi observado que no grupo VDCT o tamanho de lesão era maior quando comparado com o grupo PLCT (Teste t, $p < 0,05$, figura 10C).

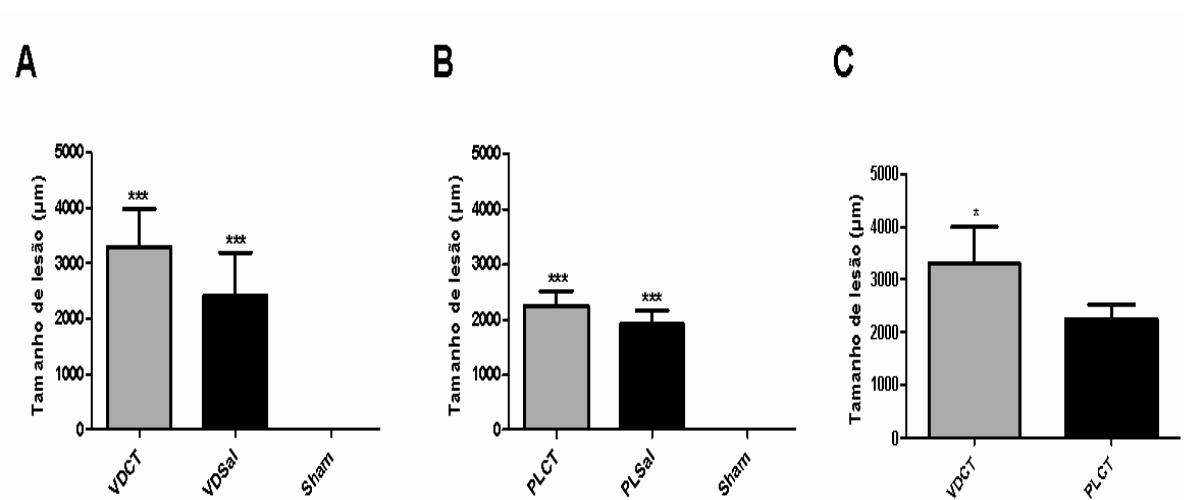


Figura - 10: Histograma dos dados das avaliações histológicas das lesões medulares. A e B, não há diferença estatística no tamanho da lesão entre os grupos transplantados por via direta (VD) ou por punção lombar (PL) e seus controles. A lesão é estatisticamente menor (ou inexistente) entre o grupo não-operado e os operados (Teste de Tukey após ANOVA de uma via $***p < 0,001$). C, a lesão é estatisticamente maior em VDCT do que PLCT (Teste t de Student $*p < 0,05$). Os dados estão expressos como a média \pm EP de cada grupo, $n=6$ por grupo.

DISCUSSÃO

Com a revisão da literatura foi possível identificar as principais vantagens e desvantagens dos variados modelos experimentais de lesão raquimedular já descritos. Alguns modelos foram prontamente descartados por necessitarem de maquinaria especializada e de alto custo, outros por serem de difícil execução e os demais por não reproduzirem a natureza do trauma observada em clínica. Após concluída uma metanálise, dois modelos foram selecionados para testes práticos. O primeiro mostrou-se impreciso, pois as coordenadas para localização do nível de lesão eram superficiais, não sendo possível ter a real certeza do nível lesionado (Da Costa, Carvalho *et al.*, 2008). O segundo modelo testado foi o de compressão por clipe de aneurisma, este modelo além de ser de fácil reprodução e baixo custo, e ainda possuir natureza de trauma semelhante a da clínica, mostrou-se satisfatório quanto à sobrevivência dos animais pós-trauma, com as sequelas de paralisia dos membros inferiores desejadas para o estudo, e extensão de lesão significativa pós clipagem. Além disso, o nível de lesão pôde ser assegurado pela contagem das costelas. Pesquisas anteriores já utilizaram este mesmo modelo para estudo de potencial de células-tronco (Karimi-Abdolrezaee, Eftekharpour *et al.*, 2006; Parr, Kulbatski *et al.*, 2008).

Na mesma proporção de que vários estudos começaram a relatar os potenciais das CTMOs, de reposição celular e neuroproteção nas lesões traumáticas experimentais de medula espinhal; muitos pesquisadores tem se empenhado em buscar a via de administração, que seja ao mesmo tempo efetiva e com capacidade de ser utilizada na clínica diária.

Embora a literatura descreva a via direta, intraparenquimatosa, como sendo a melhor via para administrar as células no local da lesão, na prática médica isto gera alguns empecilhos, sendo os principais a necessidade de novo procedimento

cirúrgico, custos mais elevados e a maior chance de lesão medular pela infusão de volumes no interior da medula espinhal. Devido a isto, o presente estudo verifica a eficácia de uma nova via de entrega das células-tronco, a via subaracnóidea por punção lombar.

Em recente estudo, Paul e colaboradores (Paul, Samdani *et al.*, 2009) administraram as CTMO na medula espinhal em dose única e compararam as três vias de administração utilizadas, a intraparenquimatosa, a subaracnoide e a intravenosa. A via intraparenquimatosa foi considerada como padrão ouro, apesar de não ter grupo controle.

A técnica de punção lombar foi utilizada por Bakshi e colaboradores (Bakshi, Barshinger *et al.*, 2006) para entrega de CTMO, sendo destacada por ser menos invasiva do que a injeção direta. Nesse estudo os autores concluíram que múltiplos transplantes aumentam o potencial de nidificação celular na região medular lesada.

Todavia, a comparação entre o “padrão ouro” (via intraparenquimatosa) com múltiplas infusões por punção lombar não havia sido relatada até o momento. No presente trabalho foi possível verificar o potencial terapêutico das CMMO na reabilitação motora, na presença e migração dessas células para o local de lesão e no tamanho da lesão após um modelo experimental de trauma da medula espinhal.

Em relação aos nossos dados de avaliação motora, através da escala de BBB, verificamos que as duas infusões de CMMO no espaço subaracnóideo foram mais efetivas na reabilitação motora dos animais, em comparação com a infusão única, intraparenquimatosa. As ratas transplantadas por punção lombar apresentaram um progresso significativo na escala de BBB a partir da segunda semana de avaliação, enquanto que os controles de solução salina mantiveram os escores baixos durante os 21 dias de seguimento. Além disso, comparando-se os grupos tratados com CMMO por PL e VD, observamos uma tendência à melhora funcional no grupo tratado por PL, o que provavelmente poderia ser comprovado pelo aumento do n nos grupos.

Neuhuber e colaboradores (Neuhuber, Barshinger *et al.*, 2008) avaliaram a função motora após transplante de células precursoras neurais (CPN) por via subaracnóidea e direta. A melhora da função motora dos animais transplantados por

punção lombar foi menor que a dos tratados por infusão direta e maior que a dos controles de veículo. Neste estudo os autores já sugerem que o aumento no número de células transplantadas por punção lombar e a determinação do melhor tempo de infusão pode melhorar a função motora dos animais, em comparação com os transplantados por injeção direta. As infusões das células foram realizadas uma única vez. Outros estudos relataram melhora motora pós-transplante direto no parênquima medular com CTMO (Chopp, Zhang *et al.*, 2000; Hofstetter, Schwarz *et al.*, 2002). Na avaliação dos escores do BBB obtidos no grupo da via intraparenquimatosa, nossos resultados contrapõem os estudos acima citados, por não haver melhora motora em relação ao seu controle e por apresentarem uma tendência a desempenho motor inferior em comparação com a via subaracnóidea.

Quanto à presença de células-tronco na região lesada, vários trabalhos demonstram, não somente, que as CTMO migram para o local de lesão como também, nidam nesta região independente da via de administração. Células-tronco já foram encontradas em lesões medulares transplantadas por distintas vias: intravenosa, intraparenquimatosa, intratecal e intraventricular (Bakshi, Hunter *et al.*, 2004; Vaquero, Zurita *et al.*, 2006; Paul, Samdani *et al.*, 2009).

Nos estudos comparativos entre diferentes vias de entrega celular a infusão intravenosa, invariavelmente, demonstrou resultados inferiores aos das demais vias (Bakshi, Hunter *et al.*, 2004; Vaquero, Zurita *et al.*, 2006; Paul, Samdani *et al.*, 2009). No estudo de Bakshi e colaboradores (Bakshi, Hunter *et al.* 2004), a infusão intravenosa foi comparada com transplante utilizando a via intraventricular e intratecal. Vaquero e colaboradores (Vaquero, Zurita *et al.* 2006), compararam com a infusão local em um modelo de LME crônica. Paul e colaboradores (Paul, Samdani *et al.* 2009) estudaram a via intravenosa em conjunto com a via intraparenquimatosa e a intratecal. Nos três estudos acima citados, o transplante de CTMO pela via intravenosa, apesar de ser eficaz para migração e nidacão celular, sempre apresentou um menor número de células no local da lesão.

Com base nestas informações e pelo fato de que na via intravenosa as células são facilmente perdidas nos outros órgãos, coração, pulmão e fígado, a mesma não foi utilizada no presente estudo. A via intraventricular, também foi excluída por ser sua execução e translação mais difícil, do que as demais.

Em nosso trabalho utilizamos a técnica de PCR para verificar a presença e migração de células para o local da lesão pós-transplante. As amostras foram retiradas dos animais para análise de PCR 24hs após a única infusão direta no parênquima e 24hs após a segunda infusão pela via subaracnóidea. Para nossa surpresa, nenhum animal dos três transplantados pela via direta apresentou positividade para presença de células no local da lesão. Pensávamos que ao injetar células diretamente no local da lesão essas seriam facilmente identificadas, por não haver problemas quanto ao tráfego no organismo. No entanto, a presença e migração de CMMO foi identificada no animal que recebeu os dois transplantes por punção lombar.

Estes resultados contrapõem-se aos achados de Paul e colaboradores (Paul, Samdani *et al.*, 2009). Segundo esses autores, a infusão direta é a melhor técnica para nidação das CTMO, seguida da PL e por último a via intravenosa. Através de marcações celulares estes eles relataram haver uma porcentagem de nidação de 8,4% e 6,1%, na infusão direta, 4,1% e 3,4%, na via subaracnóidea, e 2,3% e 1,3%, na intravenosa, respectivamente, 4 e 21 dias após transplante. Diferentemente do estudo proposto por nós, neste trabalho foram utilizadas células-tronco humanas e modelo de hemiseção por ablação.

Neuhuber e colaboradores (Neuhuber, Barshinger *et al.*, 2008), utilizando técnicas de histoquímica, demonstraram uma nidação celular 9 dias após o transplante de precursores neurais, independente da via utilizada (intraparenquimatosa ou subaracnóidea). Diversamente, dos nossos achados, os autores concluem que a injeção direta é significativamente mais efetiva do que a punção lombar na nidação celular. As diferenças do modelo proposto por nós para o descrito por Neuhuber, são o tipo celular utilizado e a gravidade da lesão medular, pois os autores utilizaram uma LME moderada, a qual tem maior potencial natural de recuperação.

A nidação de CTMO de ratos machos adultos em ratas fêmeas submetidas a um modelo de LME foi avaliada por Vaquero e colaboradores (Vaquero, Zurita *et al.*, 2006). Os relatos deste estudo apontam para uma nidação mais eficiente pela via local de administração celular em comparação com a intravenosa. Entretanto, este trabalho avaliou o potencial das CTMO em um modelo crônico de LME.

A avaliação separada da nidação de células-tronco por punção lombar foi realizada em outros estudos. Lepore e colaboradores (Lepore, Bakshi *et al.*, 2005) avaliaram a nidação e migração de CPN comparando um único transplante com transplantes em 3 tempos diferentes, através da punção lombar, em um modelo de hemiseção por ablação da medula espinhal cervical. As CPN foram encontradas na LME cervical nos dois grupos, entretanto, no grupo que recebeu os três transplantes as células foram encontradas em maior número.

Um ano mais tarde, Bakshi e colaboradores (Bakshi, Barshinger *et al.*, 2006), após verificarem que o transplante de CTMO por punção lombar foi eficaz na migração e nidação para área lesada, com capacidade de redução da cavidade de lesão, avaliaram a administração de CTMO por punção lombar sob diferentes aspectos, tais como: janela de tempo para transplante, relação entre dose-resposta e múltiplos transplantes. A partir de diferentes experimentos, utilizando animais da raça Sprague-Dawley, em um modelo de contusão espinhal de gravidade moderada, os autores concluíram que as CTMO administradas por punção lombar têm maior potencial de nidação no momento mais agudo da lesão e até duas semanas após este. Além disso, a infusão de um maior volume de células não tem relação com um aumento na nidação, sendo o número de células de 1×10^6 suficiente para uma boa nidação celular. No presente estudo foi utilizado este mesmo número de células. Por último, observou-se que os animais, nos quais foram aplicados transplantes múltiplos de CTMO (1 infusão por semana, até o total de 3 infusões), apresentaram taxa de nidação 2,3 vezes maior do que os que receberam uma dose única.

Em relação aos nossos dados histológicos, estes não demonstraram diferenças no tamanho da lesão pós-transplante de CMMO por ambas as vias quando comparados com seus controles de veículo. Entretanto, na análise separada dos grupos tratados com CMMO por PL e VD os dados demonstram uma lesão significativamente maior nos animais tratados por VD. Estudos prévios afirmam que tanto CPN (Neuhuber, Barshinger *et al.*, 2008) quanto CTMO (Bakshi, Barshinger *et al.*, 2006; Vaquero, Zurita *et al.*, 2006) são capazes de preencher a cavidade lesional, reduzindo o cisto e, por sua vez, diminuindo o tamanho da lesão, quanto transplantadas diretamente na lesão ou pela via subaracnóidea. Entretanto, estes trabalhos não possuíam grupos controle de veículo em seus delineamentos, além disso, como já foi relatado anteriormente, o tipo de célula (Neuhuber, Barshinger *et*

al., 2008), a raça do animal e gravidade de lesão (Bakshi, Barshinger et al. 2006; Vaquero, Zurita et al. 2006), diferem do nosso estudo, e ainda, o tempo de acompanhamento é muito superior ao delimitado por nós, sendo maior do que seis semanas nos estudos citados, enquanto o nosso é de apenas 3.

Com base nas informações supra-relatadas, pode-se verificar que os resultados do presente estudo, referentes à administração de CTMO via punção lombar, estão em conformidade com a literatura, pois o grupo tratado, utilizando a via subaracnóidea, apresentou significativa melhora na função motora, sendo deste grupo, também, o animal positivo para migração e presença de CTMO na LME. Assim, os achados reforçam a hipótese de que múltiplas aplicações de CTMO na fase aguda da lesão, utilizando a via subaracnóidea pela técnica de punção lombar, pode ser uma alternativa para o tratamento de LME.

Todavia, os resultados dos animais tratados com CMMO por injeção direta no local da lesão são contraditórios aos da literatura, pois este grupo não apresentou melhora funcional, presença de células no local da lesão, e ainda apresentou um tamanho de lesão pós-trauma significativamente maior do que ao dos animais do grupo PL. Atribui-se isto pela provável lesão adicional à medula espinhal quando injetado volume em seu interior, ou pelo fato de que o microambiente do tecido nervoso após a lesão não ser adequado para a nidação celular. A ocorrência de a análise histológica não ter demonstrado dados significativos quando comparados grupos CMMO com salina, enquanto a avaliação motora o fez, pode-se ser atribuída pela baixa especificidade que a histologia utilizada por nós oferece. Se tivéssemos utilizado de procedimentos imunohistoquímicos capazes de identificar a reorganização da bainha de mielina (por exemplo) no local da lesão, provavelmente apareceriam subsídios para explicar a melhora motora. A reorganização da circuitaria medular independente das modificações nas dimensões da lesão explicariam a melhora do desempenho motor dos animais tratados com CMMO por punção lombar e estaria de acordo com as observações recentes de Courtine e colaboradores (Courtine, Gerasimenko *et al.*, 2009)

Mesmo com a maioria dos trabalhos experimentais mostrando que a infusão intraparenquimatosa é a mais eficaz para o transplante de células-tronco, sabe-se que esta via não é a melhor alternativa para aplicação clínica, pois esta técnica

requere um procedimento neurocirúrgico complexo com o risco iminente de deterioração neurológica e custos mais elevados. Somado a isso, há necessidade de realizar uma laminectomia para ter acesso a medula espinhal, a qual pode aumentar o risco de deformidade espinhal (Deutsch, Haid *et al.*, 2003). A exposição da medula espinhal é dificultada pela perda da anatomia normal, seja como consequência da lesão ou pela cirurgia prévia de fixação. Isto pode também gerar dificuldades no fechamento dos planos musculares e da pele, devido à cicatriz prévia, aumentando o risco de fístula de líquido cefalorraquidiano. Essas dificuldades podem aumentar com injeções subseqüentes, pois mais cicatrização será desenvolvida. Procedimentos cirúrgicos apresentam também seus riscos inerentes, como a embolia pulmonar ou a trombose venosa profunda, as quais possuem maior incidência em pacientes com TRM.

Por outro lado, a técnica de punção lombar elimina totalmente estes riscos, por ser minimamente invasiva e já estar estabelecida na clínica. Complicações após esta técnica são raras, sendo a mais comum a cefaléia. Em pacientes que receberam transplantes celulares, essa complicação infreqüente tem ainda menos chances de ocorrer, pois a retirada de líquido é mínima.

CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou o estabelecimento de um modelo de lesão raquimedular *in vivo*, a partir do qual, foi possível estudar a terapêutica de transplantes de células da fração mononucleada da medula óssea, pela via direta e subaracnóidea, utilizando janelas de tempo distintas. Com este estudo apresentamos algumas conclusões:

- 1- O modelo experimental de lesão medular por compressão com clipe de aneurisma é adequado para investigação de terapias de tratamento para o TRM, pois traslada a natureza compressiva da contusão do TRM, causa déficits motores irreversíveis, perda do controle vesical e dano tecidual, assim como os observados em clínica.
- 2- O transplante na fase aguda da LME, utilizando a via subaracnóidea, por meio da técnica de punção lombar, em diferentes tempos de infusão, proporciona melhora da função motora.
- 3- Células da fração mononucleada da medula óssea de ratos, após serem transplantadas no espaço subaracnóideo, podem migrar e serem identificadas no local da lesão medular através da técnica de PCR.
- 4- O transplante único de CMMO diretamente no local da lesão ou múltiplo pela via subaracnóidea não foram capazes de modificar as dimensões do dano medular ocasionado pela compressão do clipe na medula espinhal quando comparados com controle de veículo, porém a lesão foi significativamente maior no grupo que recebeu CMMO por via direta quando comparado com o tratado por CMMO através de punção lombar.

PERPECTIVAS FUTURAS

O estabelecimento do modelo de lesão raquimedular e os testes realizados com as diferentes vias de administração celular, adquiridos com a realização deste trabalho, proporcionam que futuros estudos possam aprofundar os conhecimentos a cerca do potencial terapêutico das células-tronco nas LME. Para que isto seja possível, pretendemos futuramente:

1. Aumentar o tamanho da amostra e o tempo de seguimento do trabalho.
2. Aumentar o número de infusões no grupo transplantado por punção lombar, para verificar se o efeito das CMMO pode ser proporcional ao número de infusões.
3. Aperfeiçoar a técnica de infusão direta no local da lesão, com o uso de bomba de infusão ou utilizando a entrega direta das células depositadas em biomateriais, que minimizem o risco de lesão provocada pela técnica.
4. Utilizar técnicas de imuno-histoquímica para avaliar a sinaptogênes, neurogênese, mielinização e verificar a possibilidade das CMMO expressarem marcadores neurais.
5. Avaliar a hipótese de que o efeito das células transplantadas possa ser mediado por fatores tróficos e modificações do microambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, S. e M. F. Pittenger. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood, v.105, n.4, Feb 15, p.1815-22. 2005.
- Alexander, M. S. Outcomes in spinal cord injury. J Rehabil Res Dev, v.44, n.1, p.63-4. 2007.
- Alison, M. R., R. Poulsom, *et al.* Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. Nature, v.406, n.6793, Jul 20, p.257. 2000.
- Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. J Comp Neurol, v.137, n.4, Dec, p.433-57. 1969.
- Ashton, B. A., T. D. Allen, *et al.* Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. Clin Orthop Relat Res, n.151, Sep, p.294-307. 1980.
- Bakshi, A., A. L. Barshinger, *et al.* Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation. J Neurotrauma, v.23, n.1, Jan, p.55-65. 2006.
- Bakshi, A., C. Hunter, *et al.* Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. J Neurosurg Spine, v.1, n.3, Oct, p.330-7. 2004.
- Baptiste, D. C. e M. G. Fehlings. Update on the treatment of spinal cord injury. Prog Brain Res, v.161, p.217-33. 2007.
- Barros Filho, T. E. e A. E. Molina. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in Wistar rats. Clinics (Sao Paulo), v.63, n.1, Feb, p.103-8. 2008.
- Basso, D. M., M. S. Beattie, *et al.* A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma, v.12, n.1, Feb, p.1-21. 1995.
- Beattie, M. S., A. A. Farooqui, *et al.* Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. J Neurotrauma, v.17, n.10, Oct, p.915-25. 2000.
- Bethea, J. R. Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword. Prog Brain Res, v.128, p.33-42. 2000.
- Bjornson, C. R., R. L. Rietze, *et al.* Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science, v.283, n.5401, Jan 22, p.534-7. 1999.

Boido, M., R. Rupa, *et al.* Embryonic and adult stem cells promote raphespinal axon outgrowth and improve functional outcome following spinal hemisection in mice. Eur J Neurosci, v.30, n.5, Sep, p.833-46. 2009.

Bracken, M. B., M. J. Shepard, *et al.* A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. N Engl J Med, v.322, n.20, May 17, p.1405-11. 1990.

_____. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. JAMA, v.277, n.20, May 28, p.1597-604. 1997.

_____. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. J Neurosurg, v.89, n.5, Nov, p.699-706. 1998.

Brewer, K. L., J. R. Bethea, *et al.* Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. Exp Neurol, v.159, n.2, Oct, p.484-93. 1999.

Bunge, R. P., W. R. Puckett, *et al.* Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. Adv Neurol, v.72, p.305-15. 1997.

Chen, J., Y. Li, *et al.* Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. Stroke, v.32, n.4, Apr, p.1005-11. 2001.

Choi, D. W. Excitotoxic cell death. J Neurobiol, v.23, n.9, Nov, p.1261-76. 1992.

Chopp, M., X. H. Zhang, *et al.* Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. Neuroreport, v.11, n.13, Sep 11, p.3001-5. 2000.

Courtine, G., Y. Gerasimenko, *et al.* Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. Nat Neurosci, v.12, n.10, Oct, p.1333-42. 2009.

Coutts, M. e H. S. Keirstead. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. Exp Neurol, v.209, n.2, Feb, p.368-77. 2008.

Da Costa, E. S., A. L. Carvalho, *et al.* Strapping the spinal cord: an innovative experimental model of CNS injury in rats. J Neurosci Methods, v.170, n.1, May 15, p.130-9. 2008.

Da Paz, A. C., P. S. Beraldo, *et al.* Traumatic injury to the spinal cord. Prevalence in Brazilian hospitals. Paraplegia, v.30, n.9, Sep, p.636-40. 1992.

De Paula, S., S. Greggio, *et al.* Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. J Pediatr (Rio J), v.86, n.6, Nov-Dec, p.451-64.

De Paula, S., A. S. Vitola, *et al.* Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res*, v.65, n.6, Jun, p.631-5. 2009.

Deutsch, H., R. W. Haid, *et al.* Postlaminectomy cervical deformity. *Neurosurg Focus*, v.15, n.3, Sep 15, p.E5. 2003.

Devivo, M. J. Causes and costs of spinal cord injury in the United States. *Spinal Cord*, v.35, n.12, Dec, p.809-13. 1997.

Ditunno, J. F., Jr. e C. S. Formal. Chronic spinal cord injury. *N Engl J Med*, v.330, n.8, Feb 24, p.550-6. 1994.

Dohrmann, G. J. e M. M. Panjabi. "Standardized" spinal cord trauma: biomechanical parameters and lesion volume. *Surg Neurol*, v.6, n.5, Nov, p.263-7. 1976.

Eftekharpour, E., S. Karimi-Abdolrezaee, *et al.* Current status of experimental cell replacement approaches to spinal cord injury. *Neurosurg Focus*, v.24, n.3-4, p.E19. 2008.

Emery, E., P. Aldana, *et al.* Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, v.89, n.6, Dec, p.911-20. 1998.

Fuchs, E. e J. A. Segre. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, v.100, n.1, Jan 7, p.143-55. 2000.

Gibbs, R. A. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem*, v.62, n.13, Jul 1, p.1202-14. 1990.

Hofstetter, C. P., E. J. Schwarz, *et al.* Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.4, Feb 19, p.2199-204. 2002.

Jackson, A. B., M. Dijkers, *et al.* A demographic profile of new traumatic spinal cord injuries: change and stability over 30 years. *Arch Phys Med Rehabil*, v.85, n.11, Nov, p.1740-8. 2004.

Jiang, Y., D. Henderson, *et al.* Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100 Suppl 1, Sep 30, p.11854-60. 2003.

Kaji, E. H. e J. M. Leiden. Gene and stem cell therapies. *JAMA*, v.285, n.5, Feb 7, p.545-50. 2001.

Karimi-Abdolrezaee, S., E. Eftekharpour, *et al.* Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci*, v.26, n.13, Mar 29, p.3377-89. 2006.

Klusman, I. e M. E. Schwab. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. Brain Res, v.762, n.1-2, Jul 11, p.173-84. 1997.

Koda, M., S. Okada, *et al.* Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. Neuroreport, v.16, n.16, Nov 7, p.1763-7. 2005.

Kwon, B. K., W. Tetzlaff, *et al.* Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. Spine J, v.4, n.4, Jul-Aug, p.451-64. 2004.

Leal-Filho, M. B., G. Borges, *et al.* Spinal cord injury: epidemiological study of 386 cases with emphasis on those patients admitted more than four hours after the trauma. Arq Neuropsiquiatr, v.66, n.2B, Jun, p.365-8. 2008.

Lepore, A. C., A. Bakshi, *et al.* Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the lumbar cord. Brain Res, v.1045, n.1-2, May 31, p.206-16. 2005.

Lescaudron, L., D. Unni, *et al.* Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of huntington's disease: behavioral and morphological outcomes. Int J Neurosci, v.113, n.7, Jul, p.945-56. 2003.

Li, Y., J. Chen, *et al.* Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. Neurosci Lett, v.316, n.2, Dec, p.67-70. 2001.

Liu, J., H. An, *et al.* Study of bacterial translocation from gut after paraplegia caused by spinal cord injury in rats. Spine (Phila Pa 1976), v.29, n.2, Jan 15, p.164-9. 2004.

Mcdonald, J. W. e C. Sadowsky. Spinal-cord injury. Lancet, v.359, n.9304, Feb 2, p.417-25. 2002.

Metz, G. A., A. Curt, *et al.* Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. J Neurotrauma, v.17, n.1, Jan, p.1-17. 2000.

Mezey, E., K. J. Chandross, *et al.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science, v.290, n.5497, Dec 1, p.1779-82. 2000.

Morrison, S. J., N. M. Shah, *et al.* Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell, v.88, n.3, Feb 7, p.287-98. 1997.

Neuhuber, B., A. L. Barshinger, *et al.* Stem cell delivery by lumbar puncture as a therapeutic alternative to direct injection into injured spinal cord. J Neurosurg Spine, v.9, n.4, Oct, p.390-9. 2008.

Nicholson, D. W. e N. A. Thornberry. Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci, v.22, n.8, Aug, p.299-306. 1997.

- Noel, D., F. Djouad, *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. Leuk Lymphoma, v.48, n.7, Jul, p.1283-9. 2007.
- Ohta, M., Y. Suzuki, *et al.* Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. Exp Neurol, v.187, n.2, Jun, p.266-78. 2004.
- Onifer, S. M., A. G. Rabchevsky, *et al.* Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. ILAR J, v.48, n.4, p.385-95. 2007.
- Parr, A. M., I. Kulbatski, *et al.* Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. Neuroscience, v.155, n.3, Aug 26, p.760-70. 2008.
- Paul, C., A. F. Samdani, *et al.* Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. Spine (Phila Pa 1976), v.34, n.4, Feb 15, p.328-34. 2009.
- Popovich, P. G., P. Wei, *et al.* Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. J Comp Neurol, v.377, n.3, Jan 20, p.443-64. 1997.
- Resnick, D. K., S. H. Graham, *et al.* Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. J Neurotrauma, v.15, n.12, Dec, p.1005-13. 1998.
- Rickard, D. J., T. A. Sullivan, *et al.* Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. Dev Biol, v.161, n.1, Jan, p.218-28. 1994.
- Rivlin, A. S. e C. H. Tator. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. Surg Neurol, v.10, n.1, Jul, p.38-43. 1978.
- Rosenberg, L. J., Y. D. Teng, *et al.* Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin on acute white matter pathology after experimental contusive spinal cord injury. J Neurosci, v.19, n.14, Jul 15, p.6122-33. 1999.
- Rousset, C. I., J. Kassem, *et al.* Antenatal bacterial endotoxin sensitizes the immature rat brain to postnatal excitotoxic injury. J Neuropathol Exp Neurol, v.67, n.10, Oct, p.994-1000. 2008.
- Rowland, J. W., G. W. Hawryluk, *et al.* Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. Neurosurg Focus, v.25, n.5, p.E2. 2008.
- Santos-Benito, F. F., C. Munoz-Quiles, *et al.* Long-term care of paraplegic laboratory mammals. J Neurotrauma, v.23, n.3-4, Mar-Apr, p.521-36. 2006.
- Schultz, S. S. Adult stem cell application in spinal cord injury. Curr Drug Targets, v.6, n.1, Feb, p.63-73. 2005.

Sekhon, L. H. e M. G. Fehlings. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. Spine (Phila Pa 1976), v.26, n.24 Suppl, Dec 15, p.S2-12. 2001.

Song, S., S. Kamath, *et al.* Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells. Exp Neurol, v.185, n.1, Jan, p.191-7. 2004.

Stewart, R., V. B. Christie, *et al.* Manipulation of human pluripotent embryonal carcinoma stem cells and the development of neural subtypes. Stem Cells, v.21, n.3, p.248-56. 2003.

Stichel, C. C. e H. W. Muller. Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. Prog Neurobiol, v.56, n.2, Oct, p.119-48. 1998.

Suratt, B. T., C. D. Cool, *et al.* Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. Am J Respir Crit Care Med, v.168, n.3, Aug 1, p.318-22. 2003.

Tator, C. H. e I. Koyanagi. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. J Neurosurg, v.86, n.3, Mar, p.483-92. 1997.

Thiele, J., E. Varus, *et al.* Regeneration of heart muscle tissue: quantification of chimeric cardiomyocytes and endothelial cells following transplantation. Histol Histopathol, v.19, n.1, Jan, p.201-9. 2004.

Vaquero, J., M. Zurita, *et al.* Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? Neurosci Lett, v.398, n.1-2, May 1, p.129-34. 2006.

Von Euler, M., A. Seiger, *et al.* Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. Exp Neurol, v.145, n.2 Pt 1, Jun, p.502-10. 1997.

Willerth, S. M. e S. E. Sakiyama-Elbert. Cell therapy for spinal cord regeneration. Adv Drug Deliv Rev, v.60, n.2, Jan 14, p.263-76. 2008.

Wrathall, J. R., R. K. Pettegrew, *et al.* Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups. Exp Neurol, v.88, n.1, Apr, p.108-22. 1985.

Wu, S., Y. Suzuki, *et al.* Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. J Neurosci Res, v.72, n.3, May 1, p.343-51. 2003.

Wyndaele, M. e J. J. Wyndaele. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? Spinal Cord, v.44, n.9, Sep, p.523-9. 2006.

Zwimpfer, T. J. e M. Bernstein. Spinal cord concussion. J Neurosurg, v.72, n.6, Jun, p.894-900. 1990.

APÊNDICE - A

Spine Journal

Enviada em: Friday, January 28, 2011 7:49 PM

Para: Jaderson Costa da Costa

Assunto: Submission Confirmation for Bone marrow cells delivered via lumbar puncture present better outcomes than direct delivery in a spinal cord injury experimental model

Dear Dr. DaCosta,

Your submission entitled "Bone marrow cells delivered via lumbar puncture present better outcomes than direct delivery in a spinal cord injury experimental model" has been received by Spine Journal.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://spine.edmgr.com/>.

Due to the large volume of submissions being received on a daily basis, assignment of a manuscript number will occur one to three weeks from today.

Once your manuscript is given a reference number, reviewers will be assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Spine

James N. Weinstein
Editor-in-Chief

Loretta Pickett
Managing Editor

Michaela Powell
Assistant Managing Editor

Editorial Manager® - Windows Internet Explorer

I:\ENTREGA DISSERTAÇÃO\Editorial Manager®.mht

Favoritos Editorial Manager®

Spine An international journal for the study of the spine

em Editorial Manager®

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author ▾

Submissions Being Processed for Author Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Display
 Page: 1 of 1 (1 total submissions) 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date
View Submission		Bone marrow cells delivered via lumbar puncture present better outcomes than direct delivery in a spinal cord injury experimental model	01/28/2011	01/28/2011

Display
 Page: 1 of 1 (1 total submissions) 10 results per page.

Editorial Manager(tm) for Spine Journal
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Bone marrow cells delivered via lumbar puncture present better outcomes than direct delivery in a spinal cord injury experimental model

Article Type: Basic Science

Keywords: experimental SCI model; bone marrow mononuclear cells; routes of administration; intraparenchymal; subarachnoid; multiple transplants.

Corresponding Author: Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Corresponding Author's Institution:

First Author: Elisa Lettnin Kaminski

Order of Authors: Elisa Lettnin Kaminski;Asdrubal Falavigna, MD, PhD;Gianina Teribele Venturin, MSc;Daniel Marinowic;Leder Leal Xavier, PhD;Pamela Bramilla Bagattini, MSc;Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Bone marrow cells delivered via lumbar puncture present better outcomes than direct delivery in a spinal cord injury experimental model

Elisa Lettnin Kaminski,¹ Asdrubal Falavigna MD, PhD,³ Gianina Terribele Venturin Ms,¹ Daniel Marinowic,^{1,2} Pamela Brambilla Bagatini Ms,⁴ Léder Leal Xavier PhD,⁴ Jaderson Costa DaCosta MD, PhD;¹

¹ Laboratório de Neurociências,

² Laboratório de Terapia Celular, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Neurocirurgia e Coordenador do curso de Medicina da Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil.

⁴ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Corresponding Author

Jaderson Costa DaCosta MD, PhD

Laboratório de Neurociências, Instituto do Cérebro (InsCer)

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 60, 2º andar, sala 07, CEP 90619-900

Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +5551 33203250

Fax: +5551 33203312

E-mail: jcc@puers.br

Study Design. Experimental research. Four groups (n = 6 each) of Wistar rats received a spinal compression followed by bone marrow mononuclear cells (BMMC) or saline transplants by two different routes: lumbar puncture (LP) or direct injection. In the two LP groups, animals received two transplants; in the other two DI groups, animals received one single transplant. One group (sham) was submitted to the procedure without the lesion. Other 6 animals received the compression and the BMMC, and then spinal cord was prepared for PCR analyses.

Objective. Determine whether multiple transplants of BMMC by LP may be equally or more effective than one transplant by DI in a model of spinal cord injury (SCI).

Summary of Background Data. SCI causes devastating consequences for patients, and a high cost to society. Many attempts have been made to find a cure for SCI. Stem cell research has shown encouraging results, but defining the best method and time of administration remains a challenge in the clinical setting. Despite the fact that DI into the injury site allows a defined number of cells to be delivered, it is difficult to translate direct delivery to patients. Less invasive methods for cell delivery have been investigated, including intrathecal delivery by LP.

Methods. SCI compression was performed in female Wistar rats using a clip compression model. BMNCs were obtained from 15 male Wistar rats, with the Y chromosome used as a reporter of transplanted cells. BMNCs or saline were infused into the subarachnoid space via LP and directly into the site of injury. We evaluated the presence of cells after transplantation in the injured site, motor function for 3 weeks on the Basso, Beattie & Bresnahan (BBB) Scale, and the severity of the lesion on histology.

Results. BMNCs migrate and can be identified in the injured spinal cord by PCR after being transplanted into the subarachnoid space transplanted by LP, and that two transplants by this

route were more effective to promote motor improvement and significant lesion length reduction than the DI.

Conclusion. Double transplantation at different times in the acute SCI experimental model, through the LP technique, results in improvement of motor function and histology and BMNCs implantation if compared with the DI technique.

Key Points.

1. A challenge to apply BMNCs in clinical practice is to define the better route and time for transplantation.
2. DI has already demonstrated positive results in experimental application, but there are many risks to translate this technique to clinic.
3. Two BMNCs transplants by LP improve the motor functionality, the cells were found in the injury site and the lesion was lesser than DI.

Mini Abstract/Précis. This study compares two delivery methods, with different time windows, for BMNCs transplant in a model of SCI. We found that BMNCs delivering by double LP can improve motor functionality after the second week, the injury site showed less traumatic lesion and the cells can migrate to the injury site, when compared with DI.

1 Introduction

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Spinal cord injuries (SCI) are devastating, and often affect young and healthy individuals.¹ SCIs have a high incidence, between 15-40 cases per million per year globally, and imposes a heavy burden on government and society.^{2, 3} New therapeutic strategies have been investigated, such as bone marrow stem cell transplantation. The use of these cells presents advantages, such as being easily expanded *in vitro*, have no ethical concessions to their use, and no risk of rejection because they are collected from the patient himself.^{4, 5} Previous studies have shown benefits in the application in experimental SCI models with improved gait and migration to the dorsal and ventral lesion and differentiated into neurons and oligodendrocytes.^{6, 7}

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

One of the factors in stem cell therapy is the route of cell delivery and the window of opportunity in which cells should be transplanted. In animal models of SCI, the most common mode of delivery is direct injection (DI) into the injury site, which allows a defined number of cells to be delivered; however, this risks further injuring the cord.⁸⁻¹⁰ Consequently, it is difficult to translate direct delivery to patients. Less invasive methods for cell delivery have been investigated, including intrathecal delivery by lumbar puncture (LP).¹¹⁻¹³ This minimally invasive technique decreases the risk to the patient and allows delivery of multiple cell doses over a preplanned length of time.¹¹⁻¹³

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The efficacy of a single bone marrow stem cells transplantation by DI or LP was previously compared; DI demonstrated the best results therapeutically.¹⁴ On the other hand, when delivery of multiple transplants was performed by LP, migration and reduction of the cyst and injury site were observed.¹¹ However, the different therapeutic effects of these two routes - DI at the injury site or multiple infusions by LP - were never compared in SCI. Thus,

24 we aimed to compare a single infusion of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) directly
25 at the injury site with two infusions of BMMCs by LP in a model of SCI.

27 **Materials and Methods**

28 *Study design*

29 Thirty female Wistar rats (60 days old) were used as recipients and 15 male Wistar
30 rats (60 days old) were used as BMMCs donors. Animals were divided into 5 groups of 6
31 animals each: sham (controls); BMMCs recipients by DI; receiving saline by DI; receiving
32 BMMCs by LP; and receiving saline by LP.

33 On day 1, animals were subjected to spinal cord compression. On day 2 (24 hours
34 later), animals were evaluated using the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) scale, a scale
35 used to evaluate motor function.⁴ The exclusion criteria were that rats that presented a BBB
36 score more than 3 points 24 h after injury because the spinal lesion applied in this study
37 should resulted in a severe motor deficit, and rats that became sick due to a urinary infection
38 during the study. On day 3, BMMCs or saline were administrated by DI or LP. On day 9, the
39 LP groups received a second injection of BMMCs. All animals were given BBB scores at
40 days 7, 14, and 21. After the last evaluation, they were euthanized and histologic analysis was
41 performed. The experimental protocols used in this study followed international standards for
42 animal testing, and were approved by the Animal Care and Ethics Committee of Pontifícia
43 Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA 09/00109).

45 *Surgical Procedures*

46 Animals were weighed and anesthetized by intraperitoneal injection with 2% xylazine
47 (0.1 ml/g) and 10% ketamine (0.22 ml/g). The rats were positioned in ventral decubitus and
48 the skin over the thoracic spine was shaved and cleaned using antiseptic solution. The incision
49 site was determined by palpation of the last rib and counting to define the eighth rib. A 3-cm
50 incision at the midline over the dorsal region was performed with removal of paravertebral
51 muscles and locating the vertebral lamina of the eight thoracic vertebrae (T8). A T8
52 laminectomy was performed carefully under magnification and the dural sac identified. Spinal
53 cord compression was performed using a 6.7 mm clip (Vicca®) with a closing pressure of 50
54 g/strength during 60 seconds.¹⁵ After the injury, the incision was sutured with mononylon 3-0
55 and the antiseptic solution was applied to the incision. Postoperatively, ceftriaxone (100
56 mg/kg, i.p.) and tramadol (1.5 mg/kg s.c.) were administered and subcutaneous hydration with
57 10 ml of 0.9% was given. The Credé maneuver was performed at the end of the procedure to
58 empty the bladder. Postoperative care included: Credé maneuver twice daily, daily inspection
59 of the skin; pressure ulcer prevention; and fluid restriction in the acute period and night, to
60 decrease bladder strain. Rats were weighed once a week, and nutrition was limited to 20
61 grams to avoid weight gain. In case of anorexia, 10 ml of warm normal saline were
62 administered intraperitoneally. Urinary tract infection, manifested by hematuria with pus or
63 cloudy urine, was treated with amoxicillin with clavulanic acid (2 mg/100 g i.p.).^{16,17}

64

65 *Preparation of Bone Marrow Mononuclear Cells (BMMCs)*

66 BMMCs were obtained from the male Wistar rats, with the Y chromosome used as a
67 reporter of transplanted cells. Bone marrow was extracted from the humerus, femur, and tibia
68 by flushing with 10,000 U of heparin in 50 ml of DPBS. Extracts were centrifuged at $400 \times g$
69 for 10 minutes. Cell pellets were resuspended with RPMI-1640 and fractionated on a density

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

70 gradient generated by centrifugation at $400 \times g$ over a Ficoll-Paque solution (Histopaque
71 11191, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The mononuclear fraction over the Ficoll-Paque
72 layer was collected and washed twice with DPBS. Cell concentrations were determined with a
73 Neubauer-counting chamber with the number of viable cells determined by Trypan Blue
74 exclusion. For the detection of surface antigen, BMMCs were incubated with conjugated
75 antibodies against CD34, CD11b, CD117, CD45, and Sca1. Labeled cells were collected and
76 analyzed using a FACSCalibur cytometer.

77 78 *Lumbar Puncture (LP)*

79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93

BMMCs or saline were infused into the subarachnoid space via LP. A volume of 40 uL containing 10^6 cells was used. After anesthesia and skin preparation, the lumbar spinous processes of the L6 and S2 were palpated and a 27G needle was introduced into the subarachnoid space with a slight flexion of the animal's body, to facilitate access to the spinal canal. The correct needle positioning in the subarachnoid space was determined by the contraction of the tail at the time of needle insertion or cerebrospinal fluid leakage. Cell infusion was performed for 1 minute to avoid reflux. LP transplantation was performed twice at 48 hours and 9 days postoperatively.

94 95 *Direct Injection (DI)*

96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165

A volume of 30 μ l containing 1.5×10^5 cells was injected directly with a 33 gauge needle into the site of SCI. Administration was performed after reopening the paraspinous muscle planes by direct visualization under magnification. Infusion was given for 40 seconds. After infusion, the skin and muscle were resutured. The DI cells transplantation was performed only 48 hours after the surgery (day-3).

94

95

Evaluation of Motor Function

96

Hind limb motor function was evaluated using the BBB score.¹⁸ The animals were assessed 24 hours postoperatively; only those who scored less than 3 were included in the study. After the procedure, rats were evaluated once weekly for 21 days. The rats were placed in an open field and videotaped for five minutes. The films were subsequently analyzed and the animals were scored by two evaluators. If there were disagreement between evaluators, a third reviewer was consulted.

102

103

Histology

104

At day 21, after evaluation of motor function, animals were euthanized with high doses of 2% xylazine (0.1 ml/g) and 10% ketamine (0.22 ml/g) intraperitoneally. Thirty rats were perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). The spine was carefully dissected and spinal cord was removed. A piece of spinal cord, measuring 1cm, was dissected to perform the histological analysis, the main lesion produced in our study was located in the center of the piece. This piece was maintained in PFA for 24 h. The next day the spinal cords were placed in 30% sucrose for dehydration for additional 24 h. Finally, spinal cords were frozen in isopentane previously cooled in liquid nitrogen, acclimated in a cryostat (CRYOTOME®SME, SHANDON, England) sectioned at -20°C at 30 µm. All sections were processed using Nissl technique.¹⁹ The images of these sections were digitized using a stereomicroscope (Stemi SV6, Zeiss, Germany), coupled with CCD camera (Pixera 1.2, Pixera, Pixera Corporation, CA, USA) and analyzed by software Image Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, San Diego, CA, USA). Approximately 66 sections were analyzed per spinal cord/piece (the sections were analyzed in intervals of 150 µm). The sections were classified in

118 lesioned or intact. In our study was considered lesioned the sections that do not present a
119 clear anatomical definition between gray and white matter and consequently presents a
120 “reticular” aspect and were considered intact the sections that present clear limits between the
121 gray and white matter and no evident signal of lesion. The number of lesioned sections was
122 used to estimate the length of lesion in an adaptation of previously published protocols.^{20,21}

124 *Y-Chromosome detection using Polymerase Chain Reaction (PCR)*

125 We performed PCR analysis in order to identify the presence of transplanted BMMCs
126 in the spinal cords. 6 rats were subjected to the injury model: 3 received BMMC
127 transplantation by DI 48 hours after injury; the other 3 received 2 transplants by LP 48 hours
128 and 9 days after injury. 24 hours after the last transplantation in each group, rats were
129 euthanized and samples of the spinal cord collected. We used forward primer 5'-direct
130 atggagaattctgaggaggaga-3' and reverse primer 5'-attcacaagctgacctccagttg-3', complementary
131 to the DNA sequence corresponding to a specific region of the Y-chromosome, generating a
132 PCR product of 524 bp. We performed a new direct amplification using the primer 5'-
133 cagagcccaggtgctcctgctg-3' and reverse 5'-ctcctccatttagatctgcggtc-3', generating a PCR product
134 of 324 bp, using a nested PCR technique. A positive control sample (Y-chromosome + DNA
135 extracted from a male rat) and a negative control (no Y-chromosome + DNA extracted from a
136 female rat) were assayed with experimental samples in every reaction. Amplified products
137 were detected by gel electrophoresis (agarose 2% containing ethidium bromide) and
138 visualized under ultraviolet light.

140 *Statistical analysis*

141 Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) or the mean \pm standard error
1 of the mean (SEM) as indicated in the Figure Legends. Two-way analysis of variance
2 142 of the mean (SEM) as indicated in the Figure Legends. Two-way analysis of variance
3
4 143 (ANOVA) followed by the Bonferroni post-hoc test was used to analyze data obtained by the
5
6
7 144 BBB test. Data obtained on histology were analyzed using one-way ANOVA followed by the
8
9
10 145 Tukey Test and T-Student's Test. Statistical analysis was performed with PrismGraph 5.0
11
12 146 software (Graph-Pad Software, San Diego, CA). An α level of 0.05 was applied and a p-value
13
14 147 of less than 0.05 was considered statistically significant.
15
16

17 148

18

19 149

20 **Results**

21

22 150

23 *Recovery of motor function*

24

25 151 The scores of BBB in the sham group showed that the experimental model used was
26
27 152 efficient to cause a SCI; all animals in the sham group scored 21, while animals that
28
29
30 153 underwent compression scored a maximum of 7 ± 0.5 . Analysis of variance demonstrated that
31
32 154 the BBB had significantly improved in rats treated with BMMCs by LP compared with
33
34 155 controls in the last two evaluations, on days -14 and -21 ($p < 0.05$) (figure 1 A). Post-hoc
35
36 156 analysis indicated that function improved significantly beginning week 2 after transplantation.
37
38 157 DI-treated animals showed no significant improvement in motor function when compared to
39
40 158 saline-treated controls (Figure 1B). There was no significant difference when the BMMCs
41
42 159 treatment delivered by LP or DI was compared, but in all three evaluations the BBB score
43
44 160 was always better in the LP group. These results show that transplanting cells by LP is more
45
46 161 effective to improve the motor function than DI.
47
48
49
50
51

52 162

53

54

55 163

56 *Lesional Area Measurement*

57

58

59

60

61

62

63

64

65

164 The sham group the spinal cord was intact (Figure 2 A), the anatomical bondery was
165 lost in the spinal cord (Figure 2 B). The spinal cord treated by BMMCs by LP had
166 significantly less damaged areas when compared with DI delivery (figure 3 C). There were no
167 statistical differences in each group when the BMMCs treatment and control were analyzed
168 (Figure 3 A, B). The histology analysis was also statistically significant between animals of
169 the sham group and the spinal cord lesion group (Figure 3 A, B).

171 *Migration of donor-derived BMMCs to the site of injury.*

172 PCR analysis was performed on 6 spinal cord samples from injured rats transplanted
173 with BMMCs. 3 samples corresponded to those obtained from animals in which BMMCs
174 were infused twice by LP, and the remaining 3 samples were from animals where BMMCs
175 were infused directly at the injury site. Of the 6 samples, one was positive for the 342 bp
176 band, corresponding with the specific sequence of the Y-chromosome after the second
177 amplification. The positive sample corresponded to the spinal cord taken from a rat
178 transplanted via LP twice after injury, 48 hours and 7 days (Figure 4).

180 **Discussion**

181 For stem cells to be available in clinical practice, it is important to establish the most
182 effective and applicable route of administration. While the DI route has been claimed to be
183 the best route, in medical practice this creates some difficulties: the need for further surgery,
184 higher cost, and greater chance of SCI due to direct infusion into the spinal cord. Thus, we
185 aimed to verify the effectiveness of a new route for delivering stem cells, via lumbar puncture.

186 Paul et al¹⁴ studied the delivery of the stem cells in experimental SCI using a single
187 dose by DI, subarachnoid space and intravenously, and concluded that the intraparenchymal
188 route was the gold standard, although the study did not have a control group. Conversely,
189 Bakshi et al¹¹ concluded that multiple transplants of these cells by LP increase the potential
190 for cell implantation in the SCI region. However, a comparison between single
191 intraparenchymal injection and multiple infusions via LP has not been reported thus far. We
192 evaluated the effectiveness of a new route for delivery of stem cells, by spinal LP.

193 With regards to the presence of stem cells in the injured region, several studies
194 demonstrated not only that they migrate to the site of injury, but that grafts appear to function
195 independently of administration route. Stem cells have been found in SCIs transplanted by
196 intravenous, intraparenchymal, intrathecal, and intraventricular routes.^{12, 14, 22, 23}

197 Paul et al¹⁴ states that DI is the best technique for BMSC implantation, followed by
198 LP, and intravenous. Through cellular markers, they reported an implantation rate of 8.4%
199 and 6.1% in DI, 4.1% and 3.4% in the subarachnoid space, and 2.3% and 1.3 % in IV,
200 respectively, 4 and 21 days after transplantation. Neuhuber et al²⁴ used histochemical
201 techniques to show cell implantation 9 days after NPC transplantation, regardless of the route
202 used (intraparenchymal or subarachnoid). Vaquero et al²² showed more efficient implantation
203 via DI in the site of lesion compared intravenous injection. However, this study evaluated a
204 chronic model of SCI. We demonstrated that none of the 3 transplanted animals who
205 underwent DI transplantation were found to have cells at the injury site. This was contrary to
206 our expectations; we thought that cells injected directly into the injury site would be easily
207 identified, as “traffic” in the body would be eliminated with this technique. However, the
208 presence and migration of BMSCs was identified in animals that received both transplants by
209 LP. In contrast to our findings, the authors concluded that DI was significantly more effective

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

210 than LP with regards to cell implantation. This controversial result can be justified not only by
211 differences between the models previously reported, cell type, animal breed, severity of
212 injury, and only a single dose was administered in the subarachnoid space, but mainly by the
213 follow-up period; which exceeds 6 weeks in these studies, while ours is only 3
214 weeks.^{24,11,22,24,14}

215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233

A separate evaluation stem cell implantation by LP was performed in other studies. Lepore et al¹³ evaluated the implantation and migration of NPCs, comparing single and multiple transplants (three different times) by LP, in a hemisection ablation model. NPCs were found in cervical SCI in both groups; however, cells were found in greater numbers in the group receiving multiple transplants. Bakshi et al¹¹, verified that BMSCs transplanted by LP was effective in migration and implantation to the injured area, capable of reducing the cavity lesion at the most acute moment of injury to two weeks post-injury. The number of cells of 1×10^6 was enough to have a good cell implantation and larger volumes of cell infusions were not related to increased implantation. We used the same number of cells described by Bakshi.

234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265

Neuhuber et al²⁴ evaluated motor function after transplantation of neural precursor cells (NPC) in the subarachnoid space and by DI. Improvement in motor function of transplanted rats by LP was lower than those treated by DI, and higher than vehicle controls. The authors suggested that the increase in the number of transplanted cells by LP could improve motor function as compared to the DI method (cell infusions were performed only once). Other studies reported improved motor function post-transplant in the spinal parenchyma with marrow stromal cells.^{6,7} On analyzing BBB scores in the intraparenchymal group, our results appear to contradict these studies, as there was no improvement in motor function. Our data on motor evaluation by the BBB scale shows that 2 infusions of BMMCs

234 in the subarachnoid space were more effective in motor rehabilitation, compared with a single
1 235 intraparenchymal infusion. LP transplanted rats showed better BBB performance starting at
2
3
4 236 the second postoperative week, while saline controls had low scores throughout the 21-day
5
6 237 follow-up period. Although a statistical difference was not observed between the treated
7
8
9 238 groups with the BMMCs, the BBB score from the LP group was always better than the DI
10
11 239 group.

14
15 240 Previous studies reported that the stem cells can fill the cavity lesion, reduce the cyst,
16
17 241 and decrease lesion size, when transplanted directly into the lesion or by the subarachnoid
18
19
20 242 route.^{24,11,22} However In our study, the histological data showed a less damaged area after
21
22 243 transplantation of BMMCs by LP. In this group, a correlation between histology and clinical
23
24
25 244 improvement was observed.

26
27
28 245 Based on the above-reported information, it can be verified that the results observed
29
30 246 after multiple BMMCs injection by LP are consistent with the literature. The group treated by
31
32
33 247 LP showed significant motor function, migration, presence of BMMCs at the injury site and
34
35 248 less injury at the spinal cord. Multiple applications of BMMCs via LP, in the acute stage of
36
37
38 249 injury, may be an alternative for SCI treatment.

39
40 250
41 The literature review reports contradictory results observed in the animals treated with
42
43 251 BMMCs by DI. This can be attributed to the probable additional SCI or the fact that the
44
45 252 microenvironment in the nerve tissue following injury is not suitable for cell implantation.
46
47
48 253 However, even with the studies that showed that intraparenchymal infusion is most effective
49
50 254 for the transplant of stem cells, it is known that this pathway is not the best alternative for
51
52 255 clinical application. The reason was that using this technique, a neurosurgical procedure was
53
54
55 256 required running the risk of neurological deterioration, higher costs, possible spinal deformity
56
57 257 secondary to a laminectomy, difficulty in distinguishing the normal anatomy because of bone
58
59
60
61
62
63
64
65

258 or muscle injuries or previous surgeries, higher chance of cerebrospinal fluid fistula and
1 259 difficulty of muscle and skin closure due to previous scar tissue.²⁵ These problems may
2
3
4 260 increase with subsequent injections, as more healing develops. Surgical procedures also have
5
6 261 inherent risks, such as deep vein thrombosis and pulmonary embolism, which are more
7
8
9 262 prevalent in SCI patients. The LP technique eliminates these risks, is minimally invasive, and
10
11 263 can be performed in the clinic setting. Complications following this technique are rare, the
12
13 264 most common being a headache. In patients receiving transplants by the LP route, this
14
15
16 265 uncommon complication is even less likely to occur, since removal of spinal fluid is minimal.
17
18
19 266

22 267 **Support**

25 268 This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Coordenação de
26
27 269 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do
28
29
30 270 Rio Grande do Sul (FAPERGS), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
31
32 271 (PUCRS) and Pandurata Ltda.
33
34

35 272 E. L. Kaminski was a recipient of a Master's scholarship from CAPES. J. C. DaCosta is
36
37 273 researcher of the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq)
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1. Ackery A, Tator C, Krassioukov A. A global perspective on spinal cord injury epidemiology. *J Neurotrauma* 2004;21:1355-70.
2. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001;26:S2-12.
3. DeVivo MJ. Causes and costs of spinal cord injury in the United States. *Spinal Cord* 1997;35:809-13.
4. Boido M, Rupa R, Garbossa D, et al. Embryonic and adult stem cells promote raphespinal axon outgrowth and improve functional outcome following spinal hemisection in mice. *Eur J Neurosci* 2009;30:833-46.
5. Urdzikova L, Jendelova P, Glogarova K, et al. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006;23:1379-91.
6. Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000;11:3001-5.
7. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2199-204.
8. Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, et al. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair* 2006;20:278-96.
9. Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, et al. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006;26:3377-89.
10. Parr AM, Kulbatski I, Tator CH. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2007;24:835-45.

11. Bakshi A, Barshinger AL, Swanger SA, et al. Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation. *J Neurotrauma* 2006;23:55-65.
12. Bakshi A, Hunter C, Swanger S, et al. Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. *J Neurosurg Spine* 2004;1:330-7.
13. Lepore AC, Bakshi A, Swanger SA, et al. Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the lumbar cord. *Brain Res* 2005;1045:206-16.
14. Paul C, Samdani AF, Betz RR, et al. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009;34:328-34.
15. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol* 1978;10:38-43.
16. Liu J, An H, Jiang D, et al. Study of bacterial translocation from gut after paraplegia caused by spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004;29:164-9.
17. Santos-Benito FF, Munoz-Quiles C, Ramon-Cueto A. Long-term care of paraplegic laboratory mammals. *J Neurotrauma* 2006;23:521-36.
18. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995;12:1-21.
19. Costa-Ferro ZS, Vitola AS, Pedroso MF, et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure* 19:84-92.
20. Marret S, Mukendi R, Gadisseux JF, et al. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:358-70.
21. Rousset CI, Kassem J, Olivier P, et al. Antenatal bacterial endotoxin sensitizes the immature rat brain to postnatal excitotoxic injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:994-1000.

22. Vaquero J, Zurita M, Oya S, et al. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosci Lett* 2006;398:129-34.
23. Kennedy P, Scott-Wilson U, Sandhu N. The psychometric analysis of a brief and sensitive measure of perceived manageability. *Psychol Health Med* 2009;14:454-65.
24. Neuhuber B, Barshinger AL, Paul C, et al. Stem cell delivery by lumbar puncture as a therapeutic alternative to direct injection into injured spinal cord. *J Neurosurg Spine* 2008;9:390-9.
25. Deutsch H, Haid RW, Rodts GE, et al. Postlaminectomy cervical deformity. *Neurosurg Focus* 2003;15:E5.

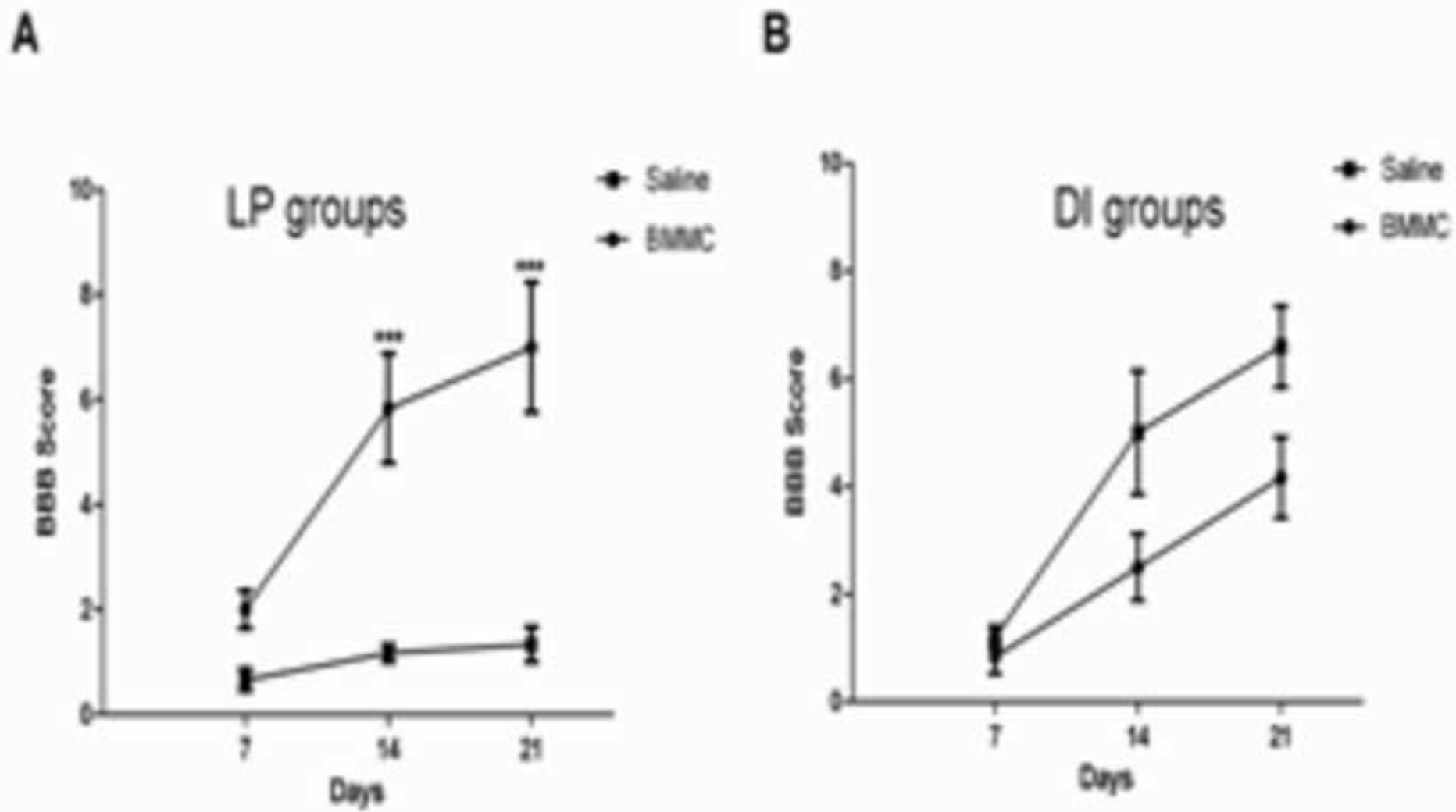
Figure Legends

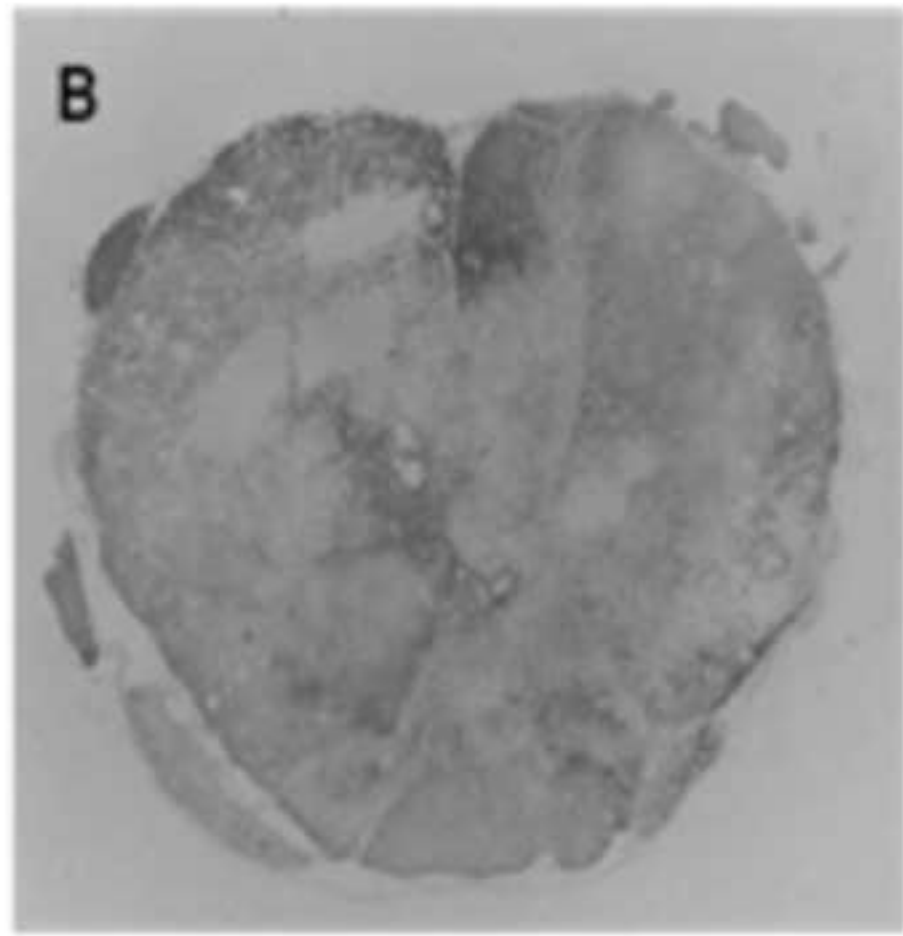
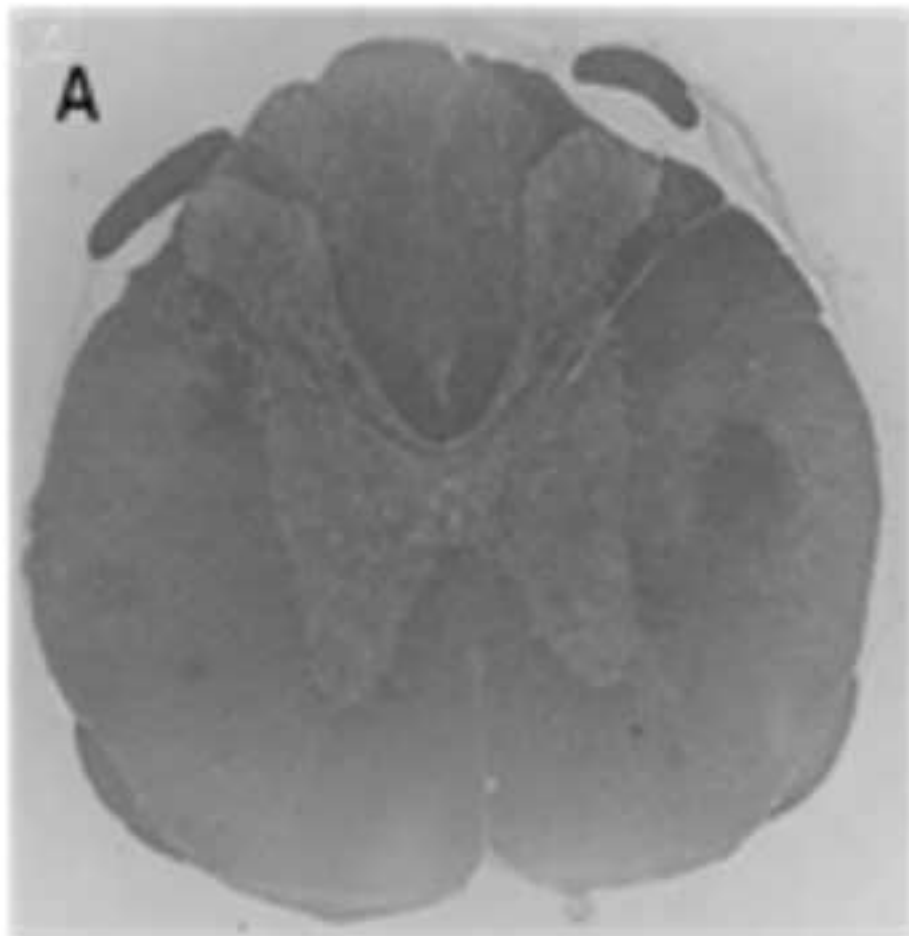
Figure 1. A, BBB had significantly improved in rats treated with BMMCs by LP compared with controls in the last two evaluations, on days -14 and -21 $***p < 0,001$. **B**, DI-treated animals showed no significant improvement in motor function when compared to saline-treated controls. Data are expressed as mean + SE of each day's observation Bonferroni test after two-way ANOVA with repeated measures, $n = 6$ per group.

Figure 2. A, spinal cord histology from Sham group, without injury evidence, however on a spinal compression group (**B**), no anatomical limits observed.

Figure 3. A, B, there was no statistical differences in injury length between BMMC or Saline transplanted by DI or PL. **A, B**, there was a statistical difference in length injury between Sham and the other groups ($***p < 0,001$) Data are expressed as mean + SE, Tukey's test after two-way ANOVA. **C**, comparing BMMC groups was observed that the injury is lesser in LP group ($*p < 0,05$) Data are expressed as mean + SE, t-Students test.

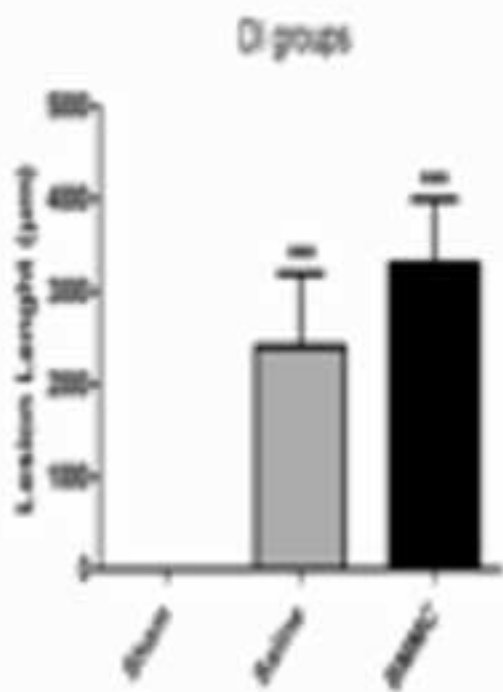
Figure 4. BMMC migration and identification in lesion site by PCR from a rat transplanted via double LP – A3 column.



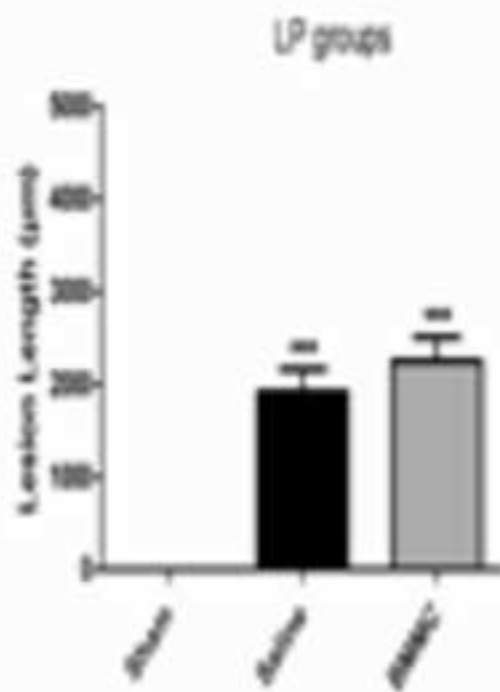


1mm

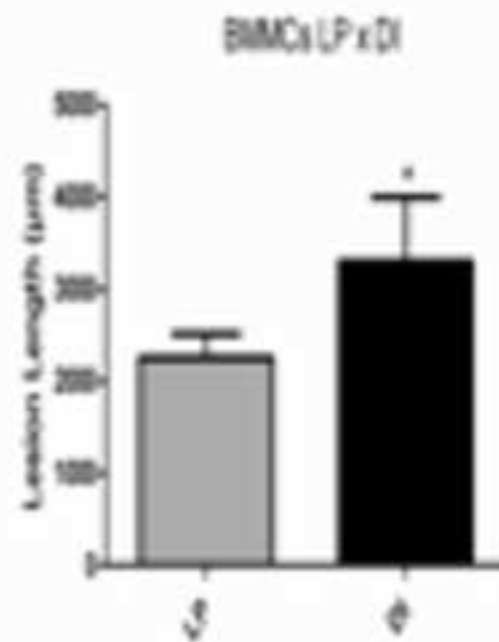
A

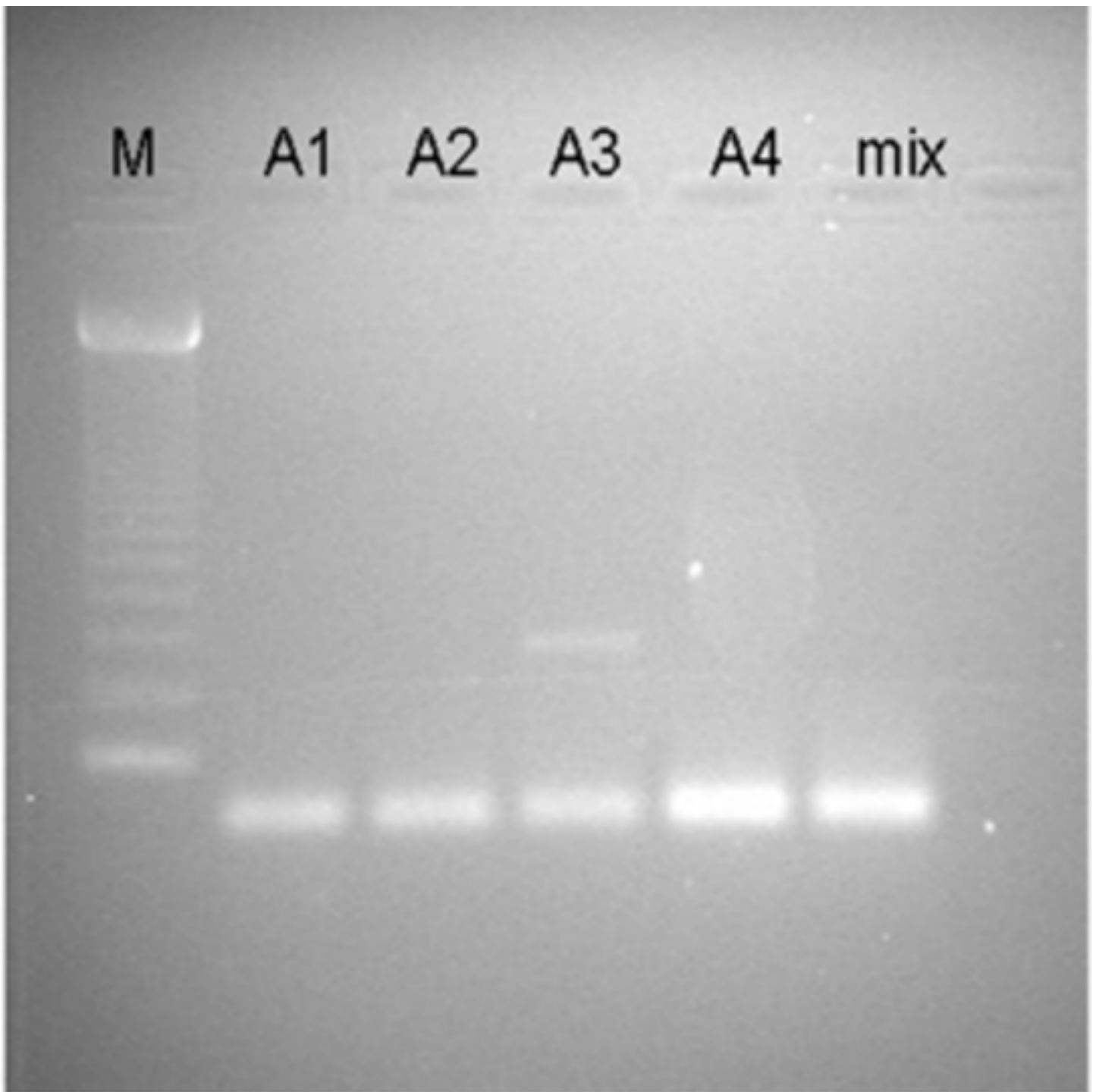


B



C





Spine
Authorship Responsibility, Financial Disclosure, and Copyright Transfer

Manuscript Title:

Corresponding Author:

Each author must read and sign the following statements; if necessary, photocopy this document and distribute to coauthors for their original ink signatures. Completed forms should be submitted with the Work or returned to: Dr. James N. Weinstein, Editor-in-Chief, Spine, 35 Centerra Parkway, HB 7254, Lebanon, NH 03766, USA.

CONDITIONS OF SUBMISSION

WORK(S) COVERED UNDER THIS AGREEMENT: This agreement includes all submitted written material as well as any supplementary digital material including but not limited to audio, video, and other data files whose formats may vary.

PREPRINTS: Upon acceptance of the article for publication, each author warrants that he/she will promptly remove any prior versions of this work (normally a preprint) that may have been posted to an electronic server.

RETAINED RIGHTS: Except for copyright, other proprietary rights related to the Work shall be retained by the authors. To reproduce any text, figures, tables, or illustrations from the Work in future works of their own, the authors must obtain written permission from Lippincott Williams & Wilkins (LWW); such permission cannot be unreasonably withheld by LWW.

ORIGINALITY: Each author warrants that his or her submission to the Work is original and that he or she has full power to enter into this agreement.

AUTHORSHIP RESPONSIBILITY: Each author certifies that he or she has participated sufficiently in the conception and design of this work, intellectual content, the analysis of data, if applicable, and the writing of the work to take responsibility for the integrity and accuracy of the data. Each has reviewed the final version of the work, believes it represents valid work, and approves it for publication. Moreover, the authors shall produce the data upon which the work is based for examination should the editors or their assignees request it.

DISCLAIMER: Each author warrants that this Work contains no libelous or unlawful statements and does not infringe on the rights of others. If excerpts (text, figures, tables, or illustrations) from copyrighted works are included, a written release will be secured by the authors prior to submission, and credit to the original publication will be properly acknowledged. Each author warrants that he or she has obtained, prior to submission, written releases from patients whose names or photographs are submitted as part of the Work. Should LWW request copies of such written releases, authors shall provide them to LWW in a timely manner.

TRANSFER OF COPYRIGHT

AUTHORS' OWN WORK: In consideration of LWW's publication of the Work, the authors hereby transfer, assign, and otherwise convey all copyright ownership worldwide, in all languages, and in all forms of media now or hereafter known, including electronic media such as CD-ROM, Internet, and Intranet, to LWW. If LWW should decide for any reason not to publish an author's submission to the Work, LWW shall give prompt notice of its decision to the corresponding author, this agreement shall terminate, and neither the author nor LWW shall be under any further liability or obligation. The authors grant LWW the rights to use their names and biographical data (including professional affiliation) in the Work and in its or the Publication's promotion.

WORK MADE FOR HIRE: If this work has been commissioned by another person or organization, or if it has been written as part of the duties of an employee, an authorized representative of the commissioning organization or employer must also sign this form stating his or her title in the organization.

GOVERNMENT EMPLOYEES: If this submission to the Work has been written in the course of the author's employment by the United States Government, check the "Government" box at the end of this form. A work prepared by a government employee as part of his or her official duties is called a "work of the U.S. Government" and is not subject to copyright. If it is not prepared as part of the employee's official duties, it may be subject to copyright.

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD/ANIMAL CARE COMMITTEE APPROVAL: Each author certifies that his or her institution has approved the protocol for any investigation involving humans or animals and that all experimentation was conducted in conformity with ethical and humane principles of research.

MUST BE COMPLETED: Device Status/Drug statement: Please select all that apply. All authors must select the same statement(s).

- The manuscript submitted does not contain information about medical device(s)/drug(s).
- The legal regulatory status of the device(s)/drug(s) that is/are the subject of this manuscript is not applicable in my country.
- The device(s)/drug(s) that is/are the subject of this manuscript is/are being evaluated as part of an ongoing FDA-approved investigational protocol (IDE) or corresponding national protocol for [*state the intended use on a separate page and attach*].
- The device(s)/drug(s) that is/are the subject of this manuscript is/are exempt from FDA or corresponding national regulations because [*state reason on a separate page and attach*].
- The device(s)/drug(s) that is/are the subject of this manuscript is/are not FDA-approved for this indication and is/are not commercially available in the United States.
- The device(s)/drug(s) that is/are the subject of this manuscript is/are not intended for human use.
- The device(s)/drug(s) is/are FDA-approved or approved by corresponding national agency for this indication.

AUTHOR(S) POSTING OF ARTICLES TO AN INSTITUTIONAL REPOSITORY

Spine will permit the author(s) to deposit for display a “post-print” (the final manuscript after peer-review and acceptance for publication but prior to the publisher’s copyediting, design, formatting, and other services) 12 months after publication of the final article on his/her personal web site, university’s institutional repository or employer’s intranet, subject to the following:

- You may only deposit the post-print.
- You may not update the post-print text or replace it with a proof or with the final published version.
- You may not include the post-print or any other version of the article in any commercial site or in any repository owned or operated by any third party. For authors of articles based on research funded by NIH, Wellcome Trust, HHMI, or other funding agency, see below for the services that LWW will provide on your behalf to comply with "Public Access Policy" guidelines.
- You may not display the post-print until twelve months after publication of the final article.
- You must attach the following notice to the post-print: “This is a non-final version of an article published in final form in (provide complete journal citation)”.
- You shall provide a link in the post-print to *Spine*’s website.

“PUBLIC ACCESS POLICY” FUNDING DISCLOSURE

Please disclose below if you have received funding for research on which your article is based from any of the following organizations:

- National Institutes of Health (NIH)
- Wellcome Trust
- Howard Hughes Medical Institute (HHMI)
- Other:
Please List _____

COMPLIANCE WITH NIH AND OTHER RESEARCH FUNDING AGENCY ACCESSIBILITY REQUIREMENTS

A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. Within medical research, three funding agencies in particular have announced such policies:

- The U.S. National Institutes of Health (NIH) requires authors to deposit post-prints based on NIH-funded research in its repository PubMed Central (PMC) within twelve months after publication of the final article in the journal.
- The Howard Hughes Medical Institute (HHMI) requires as a condition of research grants, deposit in PMC, but in its case within six months after publication of the final article.
- The Wellcome Trust requires, as a condition of research grants, deposit in UK PubMed Central within six months after publication of the final article.

As a service to our authors, LWW will identify to National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit. This Copyright Transfer Agreement provides the mechanism for identifying such articles. LWW will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by one or more of these three agencies to Pub Med Central.

Upon NIH request, it remains the legal responsibility of the author(s) to confirm with NIH the provenance of their manuscript for purposes of deposit.

Author(s) will not deposit their articles themselves.

Author(s) will not alter the post-print already transmitted to NIH.

Author(s) will not authorize the display of the post-print prior to:

- 12 months following publication of the final article, in the case of NIH,
- 6 months following publication of the final article, in the case of Wellcome Trust and HHMI

MUST BE COMPLETED: *Please select the appropriate financial/benefit disclosure statement(s). All authors must select the same statement.*

Funding Sources for this work

- 1) *No funds were received in support of this work*
- 2) *Yes, funds were received to support this work (check all that apply)*

List sources of Support: Corporate/Industry Federal Institutional Foundation, Professional Organization
 Other

Benefits received that have any relation to this work

- No benefits in any form have been or will be received from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript.
- Yes, benefits in some form have been or will be received from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript: Please check all that apply as a description of those benefits:
 - A). Although one or more of the author(s) has/have received or will receive benefits for personal or professional use from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript, benefits will be directed solely to a research fund, foundation, educational institution, or other nonprofit organization which the author(s) has/have been associated.
 - B) One or more of the author(s) has/have received or will receive benefits for personal or professional use from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript:
 - e.g., honoraria, gifts, consultancies
 - e.g., royalties, stocks, stock options, decision making position

Signature	Printed Name	Date
<input type="checkbox"/> Author's Own Work	<input type="checkbox"/> Work for Hire	<input type="checkbox"/> Government
	<input type="checkbox"/> Financial Disclosure Attached	

I was responsible for: Conception & or Design Analysis of the Data Writing and or editing of the MS Secured Funding

Signature _____ Printed Name _____ Date _____
 Author's Own Work Work for Hire Government Financial Disclosure Attached

I was responsible for: Conception & or Design Analysis of the Data Writing and or editing of the MS Secured Funding

Signature _____ Printed Name _____ Date _____
 Author's Own Work Work for Hire Government Financial Disclosure Attached

I was responsible for: Conception & or Design Analysis of the Data Writing and or editing of the MS Secured Funding

Signature _____ Printed Name _____ Date _____
 Author's Own Work Work for Hire Government Financial Disclosure Attached

I was responsible for: Conception & or Design Analysis of the Data Writing and or editing of the MS Secured Funding

Signature _____ Printed Name _____ Date _____
 Author's Own Work Work for Hire Government Financial Disclosure Attached

I was responsible for: Conception & or Design Analysis of the Data Writing and or editing of the MS Secured Funding

Signature _____ Printed Name _____ Date _____
 Author's Own Work Work for Hire Government Financial Disclosure Attached

I was responsible for: Conception & or Design Analysis of the Data Writing and or editing of the MS Secured Funding

Signature _____ Printed Name _____ Date _____
 Author's Own Work Work for Hire Government Financial Disclosure Attached

I was responsible for: Conception & or Design Analysis of the Data Writing and or editing of the MS Secured Funding

I would like this manuscript considered for the Young Investigator Award (ISSLS)

I would like this manuscript considered for an SRS issue

ANEXO - A

Avaliação Motora Funcional Escala Basso, Beatie and Bresnahan (B.B.B.)

- 0 - Nenhum movimento observável do membro posterior.
- 1 – Movimento discreto de uma ou duas articulações, normalmente o quadril e/ou joelho.
- 2 - Extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e suave movimento de uma outra articulação.
- 3 - Extenso movimento de duas articulações do membro posterior.
- 4 - Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
- 5 – Movimento discreto de duas articulações e extenso movimento de uma terceira.
- 6 - Extenso movimento de duas articulações e movimento discreto de uma terceira.
- 7 - Extenso movimento das três articulações do membro posterior.
- 8 - Largo movimento sem suporte de peso, ou apoio plantar da pata sem suporte de peso.
- 9 – Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
- 10 – Passada plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
- 11 – Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
- 12 – Passo plantar com suporte de piso frequente à consistente e coordenação ocasional dos membros anteriores e posteriores.
- 13 – Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente dos membros anterior e posterior.

14 – Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externa) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dedos no final da fase de apoio ou passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.

15 – Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo do instante do contato inicial (piso).

16 – Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante da liberação.

17 – Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial (piso) e da liberação dos dedos.

18 – Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial (piso) e rodada na liberação dos dedos.

19 – Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial (piso) e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.

20 – Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante da pata é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial (piso) e da liberação dos dedos e apresenta a

cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.

21 – Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco e cauda consistentemente elevada.