



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

SUELEN ADRIANI MARQUES

**TERAPIA CELULAR EM MODELO COMPRESSIVO DE LESÃO
MEDULAR EM CAMUNDONGO**

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SUELEN ADRIANI MARQUES

**TERAPIA CELULAR EM MODELO
COMPRESSIVO DE LESÃO MEDULAR EM
CAMUNDONGO**

Tese submetida ao Programa de Ciências Morfológicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro para a obtenção do título de Doutora em Ciências Morfológicas.

Área de concentração: Neurociência

Orientadora: Ana Maria Blanco Martinez.

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Marques, Suelen Adriani

Terapia Celular Em Modelo Compressivo De Lesão Medular Em Camundongo
/ Suelen Adriani Marques. Rio de Janeiro: UFRJ / PCM, 2008.

Xiv, 107 p.: il, apêndice 53.

Tese de Doutorado – apresentado ao Programa de Ciências Morfológicas da
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Área de concentração: Ciências
morfológicas.

Orientadora: Martinez, Ana Maria Blanco.

1 – Lesão Medular 2 – Terapia celular 3 – Análise Funcional

FOLHA DE APROVAÇÃO

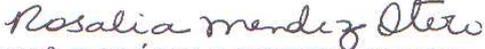
TERAPIA CELULAR EM MODELO COMPRESSIVO DE LESÃO
MEDULAR EM CAMUNDONGO

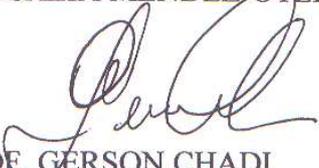
SUELEN ADRIANI MARQUES PAREDES

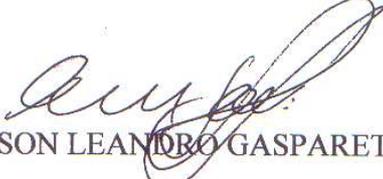
TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS (MORFOLOGIA)

APROVADA POR:


PROF. VIVALDO MOURA NETO
(Presidente da Banca)


PROF^a. ROSÁLIA MENDEZ-OTERO


PROF. GERSON CHADI


PROF. EMERSON LEANDRO GASPARETTO


PROF^a. LENY ALVES CAVALCANTE
(Revisora)


PROF^a. ANA MARIA BLANCO MARTINEZ
(Orientadora)

Rio de Janeiro, RJ, Brasil
06 de novembro de 2008

A Deus,
aos que eu amo,
aos que me amam,
e aos meus lindos filhos que
preenchem e mudam o sentido
da vida diariamente.
A todos os que sonham e
deixam sonhar!.

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram nestes 4 anos, de forma técnica, científica, ou emocionalmente para que este trabalho chegasse neste ponto. MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!VALEU!!!

Agradeço a minha orientadora Dr Ana Maria Blanco Martinez, por mais esta prazerosa jornada de aprendizado. Valeu a pena, bater o pé, e trocar de projeto. Obrigada pela oportunidade!

A Dr Silvana Allodi, pelo agradável convívio e por ser uma divertida fonte de inspiração durante estes anos.

A Dr Leny Cavalcante, por participar do início deste doutorado, quando me entrevistou para o ingresso, e da conclusão, durante a revisão desta tese. MUITÍSSIMO obrigada, pela sua atenção e boa vontade.

A Dr Elaine Del-Bel, responsável pelo laboratório de neurofisiologia molecular, na USP-Ribeirão Preto, pela recepção em seu laboratório com extrema boa vontade e cooperação, e a sua aluna Dr Valéria Garcez, pela atenção, capacidade científica e boa vontade em dividir seus conhecimentos e discutir, durante um período complicado de sua tese, um assunto que só era pertinente ao meu trabalho. Valéria muito obrigada por parar seus experimentos para me ajudar!, Rendeu frutos.

Ao Dr Radovan Borojevic, responsável pelo Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular, e a aluna Fernanda Martins Almeida pela colaboração durante este projeto.

Ao Dr Stevens Rehen, responsável pelo Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular, e sua aluna Aline Fernandes pela colaboração durante este projeto.

Aos participantes da banca para a defesa desta tese, Dr. Gerson Chadi, Dr. Rosália Mendez Otero e Dr Emerson Gasparetto. Muito obrigada por aceitarem participar deste processo.

Ao Jorge Luís, técnico do nosso laboratório, por tão prestimoso apoio neste trabalho, desculpe-me pelas inúmeras horas fazendo cortes seriados e por aquelas colorações de última hora.

As agências de fomento à pesquisa, CNPq, CAPES, FAPERJ muito obrigada pelo apoio financeiro.

Ao Dr Maurício Paredes pelo auxílio durante o estabelecimento do modelo de lesão medular, através dos seus conhecimentos como cirurgião veterinário; pelas várias horas empreendidas discutindo procedimentos, cuidados e possibilidades para avaliação; e pelo acompanhamento dos meus animais durante o período pós-operatório. Muito obrigada! E principalmente muitíssimo obrigada por entender a minha ausência, as noites sem dormir, as queixas sem fim, e por ser um excelente pai para os nossos filhos. Você sempre esteve disponível para suprir as minhas horas a mais no laboratório (que não foram poucas) e isto eu não vou conseguir agradecer. Te amo! .

Aos meus sogros, Fátima e Carlos, que fazem parte do time de apoio familiar. Também não tenho como agradecer o que fazem pelos meus filhos, nestes momentos tão conturbados de trabalhos, viagens e pesquisas. Por assegurar que eu (controladora e mãe extremada) possa ficar tranqüila em deixar meus filhos, e tenha cabeça para produzir no trabalho. Vocês vieram como bônus no casamento. Dizem que sogro e sogra é castigo. Vocês foram presentes. Muito obrigada por tudo e muito obrigada por serem avós maravilhosos!.

A Fatima Rosalino e a Flávia Frattini simplesmente por serem quem são. Vocês me fazem muito bem, estar na presença de vocês faz com que eu sorria de puro prazer. Obrigada pela ética, pelo respeito ao indivíduo, pela boa vontade e pela “lufada de ânimo” que vocês são para mim. Eu as amo!

Ao prof Marcelo Sampaio Narciso, meu companheiro de doutorado (e de pós-doc!?). Obrigada, pelos esclarecimentos histológicos, pela camaradagem, pelo refúgio na sua sala para desabafar e pelos muitos palavrões e gargalhadas. Meus almoços sem você não tem graça! É bom estar com você, brincar com você. e agora colaborar com você..Quer mais?

A todos do laboratório, muito obrigada pela companhia e compreensão. Aos meus alunos de IC, Thalita, Tamires e José, boa sorte “no fantástico e excitante mundo das pesquisas”.

E a todos que surgiram no caminho, para ajudar ou desafiar. Muito obrigada! Não seria quem sou se não houvesse vocês. Muitíssimo obrigada!

“Vê mais longe a
gaivota que voa mais alto.”

(Richard Bach)

RESUMO

A lesão medular (SCI) traumática causa déficits sensoriais e motores que prejudicam a performance funcional, e impacta significativamente a expectativa e qualidade de vida. Modelos animais fornecem uma boa oportunidade para testar estratégias terapêuticas *in vivo*. Neste estudo, nós estabelecemos um modelo simples, barato e confiável de lesão medular compressiva em camundongos, com reprodutibilidade funcional e morfológica e boa validação. Nós também introduzimos um novo teste quantitativo da recuperação funcional baseado na avaliação da mobilidade global (Marques et al., *in press*). A disponibilidade de produzir uma lesão segura com medidas de resultado apropriadas representa grande potencial para estudos que envolvem os mecanismos celulares da lesão e reparo após SCI traumático. Nós testamos os efeitos do transplante de células-tronco embrionárias (ES) e mesenquimais (MSC) em modelo compressivo de lesão medular. Fizemos laminectomia ao nível de T₉, em camundongos C57/Bl6 fêmeas, adultas jovens, e compressão extradural da medula espinal, com um clipe vascular, por 1 minuto. Foram analisados 5 grupos: laminectomia (SHAM), lesado (SCI), veículo (DMEM), tratado com ES (EST) e com MSC (MSCT), n=11 cada. ES pré-diferenciada com ácido retinóico e MSC foram injetadas (8×10^5 cells/2 μ l e 8×10^5 cells/4 μ l, respectivamente), no epicentro, 10 minutos após lesão. Avaliações comportamentais (BMS e mobilidade global) foram realizadas durante 8 semanas, quando a quantificação da substância branca e do número de fibras mielinizadas foi realizada. Análise estatística foi feita com ANOVA one-way e teste de Tukey para *post hoc*. Todos os animais lesados apresentaram paralisia flácida das patas posteriores com 24 h após lesão. Análise de mobilidade global mostrou que os animais tratados (EST 10.73 ± 0.9076 e MSCT 9.313 ± 0.289) foram mais rápidos que SCI (5.581 ± 0.2905) e DMEM (5.705 ± 0.2848), $p < 0.01$, porém mais lentos que o SHAM (15.80 ± 0.3887 , $p < 0.001$). Pela BMS, animais EST alcançaram a fase final de recuperação locomotora (3.872 ± 0.7112 , $p < 0.01$) enquanto animais SCI (2.037 ± 0.3994), DMEM (2.111 ± 0.3889) e MSCT (2.685 ± 0.431) melhoraram até a fase intermediária. A preservação da substância branca (46.80 ± 1.24) e número de fibras nervosas mielinizadas (279.4 ± 16.33) foram maior no grupo EST que no MSCT (39.97 ± 0.9252 ; 241.2 ± 22.32) ou SCI (39.97 ± 0.925 ; 81.39 ± 8.078 , $p < 0.001$). A análise ultraestrutural apresentou, nos grupos tratados, uma melhor organização do tecido e maior remielinização por oligodendrócitos e células de Schwann. O grupo EST mostrou melhor desempenho funcional e maior preservação do tecido que o grupo MSCT. Nossos resultados indicam que a terapia celular na fase aguda da lesão medular aumenta a preservação da substância branca e das fibras nervosas, melhorando a função locomotora. Nossos resultados também sugerem que ES pré-diferenciadas foram mais eficientes que as MSC para o tratamento após lesão medular aguda.

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) causes motor and sensory deficits that impair functional performance, and significantly impacts life expectancy and quality. Animal models provide a good opportunity to test therapeutic strategies *in vivo*. In this study, we established a simple, inexpensive and reliable compressive spinal cord injury model in mice, with functional and morphological reproducibility and good validity. We also introduce a new quantitative functional recovery test based on global mobility assessment (Marques et al., in press). The availability of producing reliable injuries with appropriate outcome measures represents great potential for studies involving cellular mechanisms of primary injury and repair after traumatic SCI. We tested the effects of grafts of mouse embryonic stem cells (ES) and mesenchymal stem cells (MSC) in mice spinal-cord injury (SCI). Young adult female C57/Bl6 mice were subjected to laminectomy at T9 and compression of the spinal cord with a vascular clip for 1 minute. Five groups were analyzed: laminectomy (Sham), injured (SCI), vehicle (DMEM), ES-treated (EST) and MSC-treated (MSCT), each n=11. ES pre-differentiated with retinoic acid and MSC were injected (8×10^5 cells/2 μ l and 8×10^5 cells/4 μ l, respectively) into the epicenter of the lesion, 10 minutes after SCI. Behavioral assessment (BMS and global mobility) were tested weekly up to 8 weeks, when quantification of the spared white matter and number of myelinated fibers was performed, followed by statistical analyses using one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test. All injured animals showed flaccid paralysis of the hind limbs 24 h after injury. Global mobility analysis showed that treated animals moved faster (EST 10.73 ± 0.9076 and MSCT $9.313 \pm 0.289 \pm \text{SEM}$) than SCI (5.581 ± 0.2905) and DMEM (5.705 ± 0.2848), but slower than Sham animals (15.80 ± 0.3887), $p < 0.001$. By BMS, EST animals reached the final phase of locomotor recovery (3.872 ± 0.7112 , $p < 0.01$) while animals of the SCI, DMEM and MSCT groups improved to an intermediate phase (2.037 ± 0.3994 ; 2.111 ± 0.3889 and 2.685 ± 0.431 , respectively). White-matter area (46.80 ± 1.24 , $\pm \text{SEM}$) and number of myelinated nerve fibers (279.4 ± 16.33 , $\pm \text{SEM}$) were greater in the EST than the MSCT (39.97 ± 0.9252 ; 241.2 ± 22.32 , respectively) and SCI group (39.97 ± 0.925 ; 81.39 ± 8.078 , respectively), $p < 0.05$. Ultrastructural analysis showed, in the treated groups, better tissue preservation and more remyelination by oligodendrocytes and Schwann cells than the other groups. EST group showed a better functional performance and more tissue preservation than MSCT group. Our results indicate that acute transplantation of stem cells into the injured spinal cord increased the spared white matter and number of nerve fibers, improving locomotor function. Our results also suggest pre-differentiated ES as more efficient than MSC for treatment of the acute SCI.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Figura 1: Representação esquemática do sítio da lesão medular.....	6
2. Figura 2: Caracterização morfológica da área da lesão medular.....	7
3. Figura 3: Ruptura dos tratos ascendentes e descendentes e plasticidade pós lesão.....	12
4. Figura 4: Fontes potentes de células-tronco/progenitoras para transplante após SCI.....	14
5. Figura 5: Fotos do clip vascular utilizado para promover a lesão medular.....	21
6. Figura 6: Foto do animal laminectomizado (A) e com clip durante a compressão medular (B).....	22
7. Quadro 1: Grupos controles e experimentais.....	23
8. Figura 7: Esquema do preparo das células embrionárias.....	25
9. Figura 8: Esquema do preparo das células mesenquimais.....	26
10. Quadro 2: Fases da recuperação locomotora.....	30
11. Figura 9: Ficha de avaliação da escala BMS.....	31
12. Quadro 3: Critérios para Escore da Escala BMS.....	32
13. Figura 10: Esquema para quantificar as fibras preservadas.....	36
14. Figura 11: Caracterização da lesão - Análises Funcionais.....	43
15. Figura 12: Caracterização da lesão - Análises Morfológicas.....	45
16. Figura 13: Substância branca preservada.....	47
17. Figura 14: Marcação com DAPI, GFAP e TUNEL.....	48
18. Figura 15: Cortes semifinos transversais corados com azul de Toluidina.....	49
19. Figura 16: Análise ultraestrutural com 7 dias e 56 dias após lesão.....	51
20. Figura 17: Microscopia eletrônica, com 56 dias após a lesão.....	52
21. Figura 18: Teste de mobilidade global 24 horas após lesão.....	54
22. Figura 19: Teste de mobilidade global 7 dias após lesão.....	55
23. Figura 20: Teste de mobilidade global 21 dias após lesão.....	57
24. Figura 21: Teste de mobilidade global 42 dias após lesão.....	58
25. Figura 22: Análises comparativas da progressão da mobilidade global.....	59

26. Figura 23: Análises comparativas do escore da avaliação locomotora BMS.....	61
27. Figura 24: Teste da impressão plantar.....	63
28. Figura 25: Análise estatística da impressão plantar.....	64
29. Figura 26: Microscopia de Luz, células-tronco no sítio da lesão.....	66
30. Figura 27: Avaliação quantitativa da substância branca preservada.....	68
31. Figura 28: Quantificação das fibras nervosas preservadas.....	70
32. Figura 29: Microscopia eletrônica das células em cultura.....	71
33. Figura 30: Cortes transversais ultrafinos de medula espinal, 56 dias após lesão.....	73
34. Figura 31: Cortes semifinos de medula espinal do grupo EST com 56 dias após lesão.....	74
35. Figura 32: Remielinização.....	75
36. Figura 33: Análise da janela temporal para terapia celular.....	77

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Aspecto clínicos e histo-patológicos das lesões medulares.....	1
1.1.1	Fase aguda e crônica da lesão traumática de medula espinhal.....	1
1.1.2	Eventos primários e secundários após lesão traumática da medula espinhal.....	2
1.2	Escolha do modelo de lesão medular.....	9
1.3	Terapia celular.....	12
1.3.1	Células-tronco endógenas.....	13
1.3.2	Células-tronco exógenas.....	15
2	Objetivos.....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	Materiais e métodos.....	20
3.1	Procedimento cirúrgico.....	21
3.2	Grupos experimentais.....	22
3.3	Procedimento terapêutico.....	24
3.3.1	Células-tronco – preparo.....	24
3.3.1.1	Células embrionárias de camundongo.....	24
3.3.1.2	Células mesenquimais.....	25
3.3.2	Células-tronco – administração.....	27
3.4	Avaliação da recuperação motora após lesão de medula espinhal - Análises funcionais.....	28
3.4.1	Análise da Mobilidade Global.....	29
3.4.2	Teste de campo aberto e emprego da Escala Basso para avaliação locomotora de camundongos.....	29
3.4.3	Teste de impressão dos passos.....	33
3.5	Preparo do espécime – perfusão, fixação e dissecação.....	33
3.6	Processamento para Microscopia de Luz e colorações.....	34
3.6.1	Análise morfométrica.....	35
3.6.1.1	Quantificação da substância branca preservada.....	35
3.6.1.2	Quantificação das fibras nervosas preservadas.....	36
3.6.2	Imunohistoquímica.....	37

3.6.3	Técnica de marcação do terminal desoxinucleotidila uridina-transferase (TUNEL).....	37
3.7	Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Rotina.....	38
3.8	Análise dos resultados e quantificação dos dados.....	38
4	Resultados	40
4.1	Caracterização da lesão: Análise Funcional.....	40
4.1.1	Análise de Mobilidade global.....	40
4.1.2	Teste do campo-aberto e BMS.....	41
4.1.3	Teste de impressão plantar.....	42
4.2	Caracterização da lesão: Análise Morfológica.....	42
4.2.1	Microscopia de luz.....	42
4.2.2	Quantidade de substância branca preservada.....	46
4.2.3	Imunomarcacão e reação para TUNEL.....	46
4.2.4	Cortes semifinos e ultrafinos.....	46
4.3.	Terapia celular: Análise Funcional	53
4.3.1	Análise de Mobilidade global.....	53
4.3.2	Teste do campo-aberto e BMS.....	60
4.3.3	Teste da impressão plantar.....	62
4.4	Terapia celular: Análise Morfológica.....	65
4.4.1	Microscopia de luz.....	65
4.4.2	Quantidade de substância branca preservada.....	67
4.4.3	Fibras mielínicas normais preservadas.....	69
4.4.4	Microscopia eletrônica.....	69
4.5	Terapia celular: Janela temporal para terapia.....	76
5	Discussão.....	78
5.1	Caracterização da lesão.....	78
5.2	Terapia celular	84
6	Conclusões.....	96
7	Perspectivas.....	97
8	Referências.....	98
9	Apêndice.....	108

8.1	Apêndice A.....,	108
8.2	Apêndice B.....,	120

1 INTRODUÇÃO

A incidência de lesão traumática em medula espinal é bastante elevada; estima-se que 2.5 milhões de pessoas vivam com lesão medular (SCI, do inglês spinal cord injury) em todo o mundo e novos casos são registrados a cada ano. Esta lesão tem grande impacto na qualidade e expectativa de vida, além de ser um grande fardo econômico para toda a sociedade (Sekhon e Fehlings, 2001; Priebe et al., 2007). Até o início da segunda guerra mundial a taxa de sobrevivência dos pacientes com lesão traumática aguda de medula espinal era menor que 5 % e isto se devia principalmente ao longo tempo de imobilização no leito. Atualmente, com a melhora das intervenções médicas, a taxa de sobrevivência chega a 95% (Houle e Tessler, 2003; Schwab et al., 2006). Porém, estes pacientes mantêm uma limitação físico-funcional importante durante toda a sua vida (Schwab et al., 2006).

1.1 Aspectos clínicos e histo-patológicos das lesões medulares

1.1.1 Fase aguda e crônica da lesão traumática de medula espinal

No aspecto clínico, os danos e a recuperação após trauma agudo do sistema nervoso central (SNC) incluem 3 fases características. A fase aguda, iniciada imediatamente após o impacto mecânico, a fase intermediária ou sub-aguda, com estágios iniciais entre 24-72 horas após lesão, e a fase crônica da lesão, descrita em humanos após aproximadamente 60 dias de lesão e em animais, após 4 semanas de lesão (Tator, 1995; Houle e Tessler, 2003; Hagg e Oudega, 2006; Schwab et al.,

2006). A fase sub-aguda, com até 2 semanas após lesão é considerada como um período com grande potencial para intervenção terapêutica (Coumans et al., 2001).

Em lesões medulares, a fase aguda é caracterizada clinicamente pelo estado de choque medular, e neuropatologicamente pelo aumento no volume do tecido lesado, causado por um conjunto de processos patológicos referidos como injúria secundária à lesão (Tator e Fehlings, 1991; Beattie e Bresnahan, 2000). O choque medular é descrito como a perda transitória imediata da atividade reflexa abaixo do nível da lesão e a completa ausência de resposta aos estímulos nociceptivos na pele. Qualquer resposta reflexa dos membros, por menor que seja, em resposta ao estímulo nocivo da pele é considerado um sinal de recuperação do choque medular (Tator e Fehlings, 1991; Claxton et al., 1998). O termo lesão secundária descreve os danos causados pelas mudanças subseqüentes no meio extracelular, e é usado para distinguir dos danos causados pela lesão primária, descrita como o impacto mecânico original (Sekhon e Fehlings, 2001).

1.1.2 Eventos primários e secundários após lesão traumática da medula espinal

A fisiopatologia da SCI é um processo com duas etapas que envolvem mecanismos primários e secundários de lesão. Os eventos primários estão relacionados com os danos mecânicos e privação de energia, enquanto os eventos secundários estão relacionados a cascatas de processos biológicos e celulares que são quase instantaneamente deflagradas pelo processo de injúria primária (Sekhon e Fehlings, 2001; Ronsyn et al., 2008). Inicialmente, os danos mecânicos à medula espinal resulta em morte celular no sítio da lesão, incluindo neurônios locais, astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais, e a interrupção dos tratos

ascendentes e descendentes. Como as funções sensoriais, motoras e autonômicas de cada segmento dependem crucialmente das conexões com sítios supra-espinhais para todas as ações voluntárias ou conscientes, os danos funcionais referentes à perda destes circuitos levam ao isolamento parcial ou total dos segmentos abaixo da lesão, o que trás conseqüências debilitantes para o paciente (Bradbury e McMahon, 2006; Hagg e Oudega, 2006).

A lesão da medula espinal deflagra cascatas de eventos destrutivos e estes processos, denominados eventos secundários à lesão, englobam vários mecanismos patológicos, entre eles: respostas vasculares, (isquemia, necrose, edema), apoptose neuronal e glial, excitotoxicidade, desmielinização, resposta inflamatória, formação de radicais livres, degeneração axonal anterógrada e retrógrada e formação de cicatriz (Casha et al., 2001; McDonald e Sadowsky, 2002; Kwon et al., 2004; Hagg e Oudega, 2006; Schwab et al., 2006, Ronsyn et al., 2008). Estes eventos resultam na perda progressiva de substância branca e cinzenta e conseqüente agravamento do déficit funcional (Reier, 2004).

Os danos vasculares iniciais são decisivos para a evolução dos eventos destrutivos durante a fase secundária da lesão. A perda do fluxo sanguíneo, durante a compressão, e o prejuízo a este fluxo após a lesão, promove anóxia e edema. A morte das células endoteliais dos vasos sanguíneos resulta em hemorragia e distúrbios na oxigenação e na nutrição para a área danificada e sua circunvizinhança. A área hemorrágica inicialmente restrita à substância cinzenta, altamente vascularizada, expande-se à substância branca em direção rostral e caudal (Reier, 2004; Hagg e Oudega, 2006). O tecido próximo ao sítio da lesão é seriamente danificado, pois seu suprimento sanguíneo fica prejudicado devido à perda da autoregulação e vasoespasmo. Novos vasos sangüíneos são formados

após a lesão medular; esta resposta angiogênica após injúria é descrita na primeira fase, no período de 3 a 7 dias após lesão, mas não na segunda fase, entre 28 e 60 dias após injúria. Aparentemente esta resposta angiogênica não tem efeito significativo no resultado da recuperação, mas demonstra a habilidade de auto-reparo da medula espinal (Casella et al., 2006).

Acredita-se que durante o período de isquemia, ocorra a morte neuronal (por apoptose e necrose) e a perda dos axônios centrais mielinizados devido a privação no suprimento de glicose e oxigênio a estes tecidos, seguido pela re-oxigenação. A manutenção desta depleção energética, por aumento da disfunção metabólica após lesão, acentua a morte celular por isquemia (Schwab et al., 2006). Esta morte celular contínua, aumenta os níveis de aminoácidos excitatórios, tais como, glutamato e aspartato, os quais contribuem para a morte celular por excitotoxicidade (Park et al., 2004). Essa apoptose ocorre pela hiperativação dos receptores do tipo NMDA ou dos receptores de glutamato tipo AMPA/Kainato. Todo tipo de célula neural na medula espinal lesada pode morrer por ativação de ambos os tipos de receptores, porém as células gliais, principalmente oligodendrócitos, são mais susceptíveis à morte celular por ativação dos receptores do tipo AMPA/Kainato (Hagg e Oudega, 2006). A morte, direta ou indireta, de oligodendrócitos após a lesão pode acontecer a partir de qualquer evento primário ou secundário descrito, e agrava a desmielinização no sítio da lesão e regiões próximas, causando desmielinização dos tratos poupados, dificultando a condução elétrica e sua função (Casha et al., 2001; Houle e Tessler, 2003; Hagg e Oudega, 2006).

A quebra da barreira hemato-nervosa causa o influxo de células inflamatórias, primeiro neutrófilos e por último linfócitos T e macrófagos (Bareyre e Schwab, 2003). O acúmulo, principalmente de macrófagos e linfócitos, no tecido nervoso danificado,

pode piorar os eventos mediados pela necrose (Popovich, 2000). Acredita-se que micróglia e macrófagos ativados sejam os principais contribuintes celulares para a resposta inflamatória observada após lesão, a qual contribui para a formação de radicais livres, peroxidação lipídica, formação de edema e apoptose celular, principalmente de neurônios e oligodendrócitos (Schwab et al., 2006).

O estiramento dos axônios, principalmente os mielinizados de grande calibre, pode causar danos na membrana, perda da homeostasia eletrolítica e influxo excessivo de cálcio, que somados contribuem para degeneração axonal progressiva (Shi e Pryor, 2002). O coto distal à lesão (parte isolada do corpo celular) sofre retração dos terminais sinápticos e entra em degeneração Walleriana (DW), e embora o segmento proximal possa sobreviver, ele não regenera espontaneamente. A regeneração axonal após SCI é limitada devido às características intrínsecas do microambiente no sistema nervoso central (SNC). O axônio lesado encontra uma série de fatores inibitórios no neurópilo do SNC lesado, que não são permissivos ao crescimento axonal e que impedem o sucesso da resposta regenerativa (Bradbury e MCMahon, 2006). O ambiente glial, no SNC adulto, inclui moléculas derivadas da mielina, tais como, NOGO-A, MAG (do inglês, myelin-associated glycoprotein), OMgp (do inglês, oligodendrocyte myelin glycoprotein), Sema4D/CD100 (do inglês, transmembrane semaphorin 4D) e efrina B3 (do inglês, ephrin B3) que são inibitórias ao crescimento axonal, assim como proteoglicanos de condroitin sulfato (tais como agrecan, brevican, neurocan, versican, fosfacan e NG2), expressos pelos astrócitos na cicatriz glial, que também constituem uma barreira principal para a regeneração efetiva dos axônios (Yiu e He, 2006).

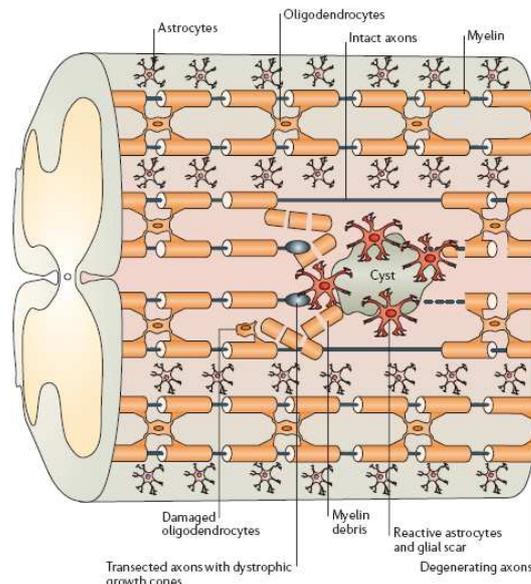


Figura 1: Representação esquemática do sítio da lesão na medula espinal. A lesão geralmente resulta em transecção das fibras nervosas e dano dos tecidos ao redor. Durante a fase inicial da lesão, moléculas inibitórias associadas à mielina dos oligodendrócitos e dos debris de mielina restringem o crescimento axonal. O recrutamento de células inflamatórias e astrócitos reativos levam à formação da cicatriz glial, e da formação cística. A formação desta cicatriz está associada ao aumento da liberação de proteoglicano condroitin sulfato, o qual limita a regeneração. Juntos, estas moléculas inibitórias tornam o meio do sistema nervoso central hostil ao reparo axonal espontâneo. Extraído de Yiu e He, 2006.

Durante a fase secundária da lesão, ocorre a formação de uma cicatriz no sítio de impacto; em camundongos, pode-se distinguir, a partir de análise morfológica, a formação de 3 regiões distintas (ver figura 1) após lesão traumática da medula espinal, são elas:

- o sítio da lesão,
- a cicatriz glial e
- a área ao redor.

Esta cicatriz é formada principalmente pela invasão de fibroblastos meningeais e astrócitos reativos sobreviventes. Após lesão, a expressão de proteoglicanos de condroitin sulfato, pelos astrócitos, é aumentada rapidamente, formando um gradiente inibitório que é maior no centro da lesão e diminui gradualmente em direção às áreas de penumbra ao redor da lesão (Camand et al., 2004; Yiu e He,

2006). Este gradiente limita o crescimento e emissão de prolongamentos neurais através da região da lesão (Camand et al., 2004).

O sítio da lesão é descrito como a região central, preenchida por fibroblastos meningeais e um denso componente de matriz conjuntiva, positivo para imunomarcção de fibronectina e tenascina-C (Camand et al., 2004, Rice et al., 2007). A cicatriz glial delimita este sítio da lesão, e apresenta uma região positiva para imunomarcção de GFAP (do inglês glial fibrillary acidic protein) com alta densidade celular. A área ao redor, apesar de também ser GFAP positiva, apresenta baixa densidade celular (Camand et al., 2004).

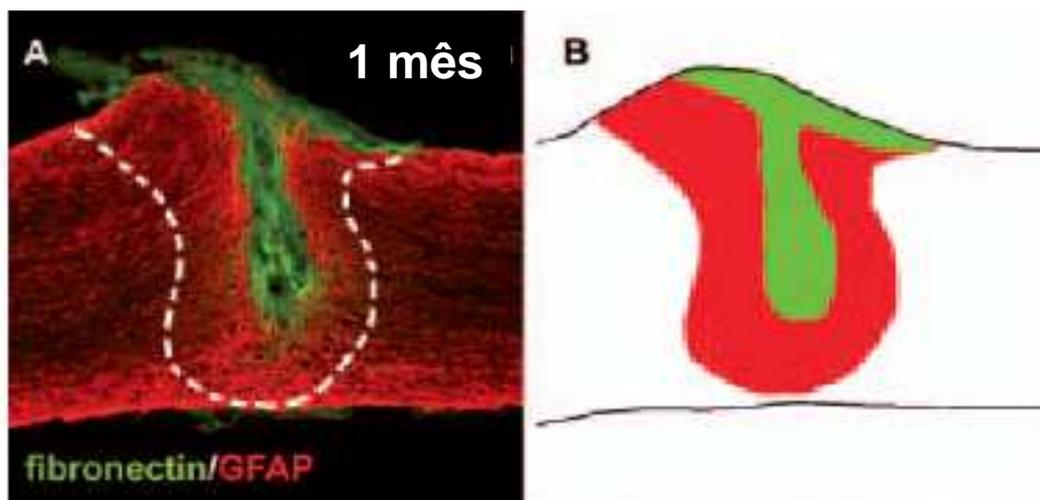


Figura 2: Caracterização morfológica da área da lesão medular. Em modelo de hemiseção em camundongos, 3 áreas distintas podem ser observadas. **A** - Imunohistoquímica para Fibronectina (verde) e GFAP (vermelho) na região da lesão medular, caracterizando as 3 regiões distintas da lesão, região central (verde), cicatriz glial mais íntima e área ao redor (pontilhado delimita estas duas regiões GFAP⁺). Observe a ausência de cavitação na região central da lesão, a qual é preenchida por tecido de matriz. **B** – esquema da área da lesão. Extraído de Camand et al., 2004.

A substância cinzenta da região central apresenta pequenas cavidades delineadas por pequenas células e macrófagos e assemelha-se com os cistos que são achados em outros mamíferos após lesão de medula espinhal (Ma et al., 2001). Apesar da formação destes microcistos ao redor da substância branca e dentro da cicatriz da lesão, em camundongos nenhuma grande cavidade desenvolve-se no

centro desta, mesmo 1 ano após lesão (Ma et al., 2001; Camand et al., 2004; Hagg e Oudega, 2006; Rice et al., 2007). Em humanos, assim como em ratos, é comum o desenvolvimento desta grande cavitação central à lesão (Hagg e Oudega, 2006). Apesar desta diferença na resposta à lesão medular entre camundongos e humanos, ainda não explicada, sabe-se que existem inúmeras similaridades na resposta pós-lesão, que permite o emprego deste animal em estudos de lesão medular traumática (Hagg e Oudega, 2006). Atualmente, camundongos geneticamente modificados são amplamente usados em pesquisas (Zheng et al., 2006; Saadoun et al., 2008), por isso, modelos experimentais de SCI desenvolvidos em camundongo oferecem esta vantagem adicional sobre outros modelos experimentais, devido à facilidade de testar as relações entre mutações genéticas específicas e os mecanismos que promovem ou previnem a recuperação (Basso et al., 2006).

A maior parte dos processos que iniciam na fase subaguda continua durante a fase crônica da lesão e resulta na atrofia da medula espinal. A cicatriz glial permanece presente e, embora alguns estudos afirmem que a composição molecular desta cicatriz no SNC torna-se permissiva à regeneração com o passar do tempo, a região central à lesão continua expressando moléculas inibitórias ao crescimento axonal, tais como proteoglicanos de condroitin sulfato e tenascina, e funciona como uma barreira no sítio da lesão (Dusart et al., 1999, Camand et al., 2004).

1.2 Escolha do modelo de lesão medular

Modelos experimentais de SCI, aguda ou crônica, oferecem uma oportunidade para examinar os mecanismos associados com a degeneração e testar abordagens regenerativas. Os modelos animais fornecem uma ótima oportunidade para testar estratégias terapêuticas *in vivo*, e são componentes indispensáveis para uma adequada aplicação clínica. Nas últimas décadas, vários modelos de lesão medular foram desenvolvidos em pequenos animais, principalmente ratos e camundongos. Os modelos podem manter a continuidade da medula, como nos modelos de contusão (por queda de peso) ou compressão da medula espinal, ou não, como nos modelos de transecção completa. Contudo, a escolha do modelo a ser usado deve ser adequada para responder as questões investigadas (Schwab et al., 2006).

Na prática clínica, a maioria das lesões traumáticas agudas de medula espinal em humanos, não são por transecções completas, e sim um misto de elementos de contusão, compressão e possivelmente transecção parcial (Kakulas, 1984). Por isso, os modelos de compressão ou contusão estão mais próximos de simular as situações vistas na prática clínica, na maioria dos casos. A maior diferença nos mecanismos patológicos dos modelos de contusão ou compressão em relação aos modelos de transecção, é que mesmo nas lesões severas, nos dois primeiros casos, sempre há grupos de axônios preservados na periferia (Bresnahan et al., 1987; Basso et al., 1996; Kamencic et al., 2001; Ma et al., 2001; Hagg e Oudega, 2006). Esta observação feita em modelos animais de lesão medular é paralela com achados de autópsia em pacientes humanos com lesão medular funcionalmente completa, sem nenhuma função sensorial ou motora abaixo da lesão (Hayes e

Kakulas, 1997). Acredita-se que estes axônios poupados sejam um bom alvo para intervenções terapêuticas após lesão medular (Beattie e Bresnahan, 2000; Kamencic et al., 2001).

O modelo animal de lesão por compressão da medula espinal, foi desenvolvido com sucesso utilizando compressão extradural por um balão inflável ou pelo fechamento temporário de um clip de aneurisma ao redor da medula espinal exposta (Rivlin e Tator, 1978). Rivlin e Tator, em 1978, descreveram um modelo animal de compressão aguda de lesão medular, no qual, a medula era exposta por laminectomia, mantendo a duramater intacta, e a compressão medular extradural era realizada com um clip vascular de aneurisma do tipo Kerr-Lougheed. Neste clip há como graduar a força de compressão exercida sobre o tecido, e este fator, somado à variação no tempo de compressão medular, determina a gravidade da lesão. Este modelo é simples e reprodutível em pequenos roedores, e permite ao pesquisador variar a severidade da lesão produzida (Dolan et al., 1980). A lesão gerada pela compressão do clip é muito mais consistente com respeito à recuperação clínica que as injúrias produzidas pelo método de queda do peso (Khan e Griebel, 1983). A lesão primária no modelo animal, gerado pelo fechamento temporário do clip ao redor da medula espinal, inclui elementos de contusão e compressão. A contusão é causada pelo impacto do clip no início da fase de fechamento sobre o tecido da medula espinal. O mecanismo de compressão da medula é óbvio enquanto o clipe está fechado ao seu redor, e a severidade da lesão depende da duração deste fechamento. O resultado da contusão sobre a medula é a lesão mecânica imediata com interrupção da estrutura e hemorragia, e o resultado da compressão é o deslocamento temporário do tecido e isquemia. Este mecanismo de injúria simula, intimamente, a situação clínica de um paciente que sofre um trauma medular, no

qual os fragmentos da vértebra são propelidos a força para dentro do canal medular (contusão) e conseqüentemente levam a compressão da medula espinal (Dolan et al., 1980).

Ao contrário de muitos outros modelos de lesão medular aguda, os animais lesados pela compressão do clip ficam completamente paraplégicos após compressão, com seus membros posteriores flácidos e sem resposta ao toque ou dor. Não há diurese espontânea, sendo necessárias manobras compressivas para o esvaziamento diário da bexiga, até que esta recupere sua função, em torno de 3 a 4 dias após lesão (Khan e Griebel, 1983).

Apesar da grande incidência de lesões cervicais, a sobrevivência dos casos de quadriplegia em humanos é muito menos freqüente do que na paraplegia (Sekhon e Fehlings, 2001). Nos modelos animais a quadriplegia traz grandes problemas em relação ao autocuidado e manutenção da vida destes animais, devido à ampla imobilização e restrição muscular, enquanto os animais paraplégicos, apesar de ter função de locomoção limitada, compensam muito bem a perda da função dos membros posteriores em relação à higiene do corpo e à alimentação. E principalmente, nestes modelos com paraplegia não há comprometimento da respiração ou graves alterações circulatórias, que comprometam a vida (Schwab et al., 2006). Nos modelos animais com lesões ao nível torácico, a circuitaria segmentar e motoneurônios envolvidos no padrão automático gerador de marcha, necessários para locomoção, são poupados. Este fato permite a análise da recuperação locomotora após lesão, uma vez que a indução do padrão gerador central de marcha (CPG, do inglês central pattern generator), localizado na circuitaria lombar, pode permitir certo grau de recuperação da função locomotora

mesmo sem tratamento (Beattie e Bresnahan, 2000; Pearson, 2001; Collazos-Castro et al., 2006; Harel e Strittmatter, 2006).

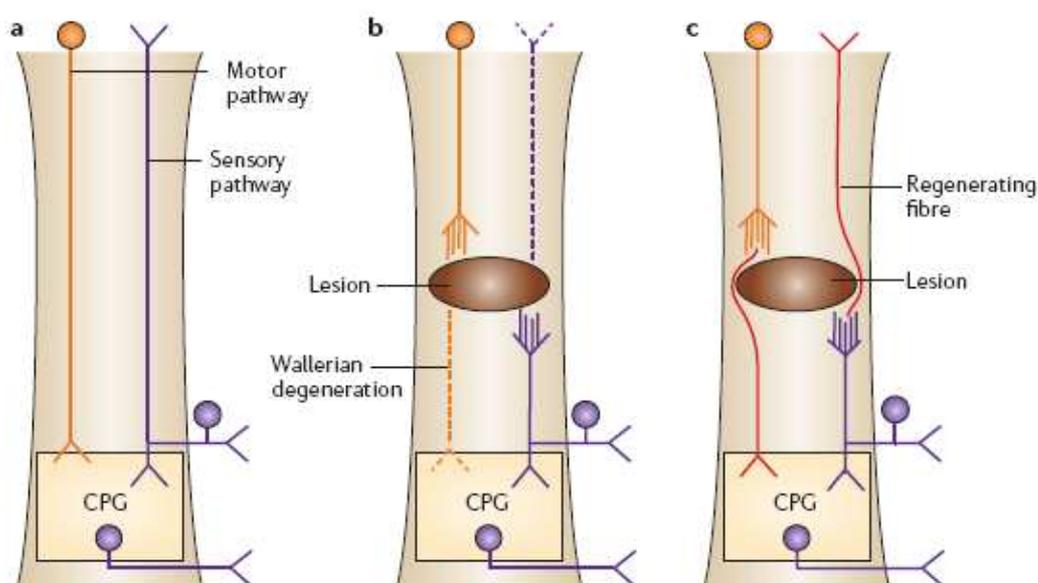


Figura 3: Ruptura dos tratos ascendentes e descendentes e plasticidade pós lesão. O déficit funcional está associado com a interrupção dos longos tratos ascendentes e descendentes da medula espinhal. (a) tratos ascendentes e descendentes normais, conectando centros corticais com centros medulares e regiões periféricas. (b) Quando lesados, o segmento distal destes tratos sofrem degeneração Walleriana e o segmento proximal não regenera plenamente, falhando na reconexão com seus alvos. Por isso, informações ascendentes (sensoriais) não alcançam os centros supra-espinais e as descendentes (motoras e autonômicas) são desconectadas da circuitaria caudal espinhal, incluindo o CPG, o qual é responsável pela função locomotora coordenada. Muitas das pesquisas em lesão medular focam na possibilidade de induzir estas vias de projeção lesadas a regenerar e formar a circuitaria original, com o arranjo normal, como ilustrado em (c) . Axônios regenerando estão em vermelho.

1.3 Terapia Celular

Há um grande número de abordagens terapêuticas com o intuito de promover a recuperação funcional após lesão medular. Estas estratégias incluem neuroproteção e regeneração através do transplante de células-tronco, de várias linhagens, e a injeção de fatores neurotróficos e drogas antidegenerativas (Reier, 2004; Schwab et al., 2006). A abordagem baseada em terapia celular, utilizando várias linhagens de células-tronco (ver figura 3), tem sido considerada como o tratamento de maior potencial de reparo funcional após lesão medular, devido a dois

possíveis mecanismos: restituição da mielina dos grandes tratos (referido como abordagem “regenerativa”) e reposição celular (isto é, neurônio ou oligodendrócito) (Reier, 2004).

O transplante celular após lesão medular tem vários objetivos, entre eles, preencher a cavidade da lesão para fazer uma ponte que una as bordas das áreas preservadas, repor as células mortas (novos neurônios ou células mielinizantes), e tornar o meio favorável para a regeneração axonal (Thuret et al., 2006). Diferentes tipos celulares têm sido propostos para regenerar lesão medular em modelos animais, incluindo células mesenquimais, células de Schwann, células embainhantes olfatórias, células precursoras neurais derivadas de células adultas e embrionárias (Au et al., 2007; Biernaskie et al., 2007; Lim et al., 2007; Toft et al., 2007).

Apesar do fato de diferentes tipos celulares serem testados em modelos animais de lesão medular, não há nenhum consenso em qual é o melhor tipo celular, em termos de resultados funcionais, para o uso em ensaios clínicos. Tratamentos futuros indubitavelmente envolverão a síntese de várias abordagens complementares, e muitas combinações de terapias certamente serão incorporadas como rotina de tratamento.

1.3.1 Células-tronco endógenas

O cérebro e medula espinal adulta apresentam células-tronco neuronais endógenas que são hábeis para divisão e diferenciação durante toda a vida e reagem a estímulos estressantes, ou podem ser alvo de modulação farmacológica (Magavi et al., 2000). Gage (2000) descreveu o papel destas células-tronco endógenas no hipocampo, relacionando-as com aprendizado e memória. E em modelo de desmielinização aguda, estas células apresentaram capacidade de

proliferação e diferenciação em oligodendrócitos mielinizantes (Gensert e Goldman, 1997). O potencial destas células-tronco endógenas para migrar, diferenciar e repor neurônios perdidos no córtex motor, e a habilidade para estabelecer circuitarias e emitir longos axônios em direção aos seus alvos na medula espinal, seguindo o trajeto adequado do tracto cortico espinal, foi evidenciado por Chen e colaboradores (2004). Estes resultados demonstram o potencial destas células para contribuir com alguma renovação celular após danos, mesmo que não restituam completamente as estruturas perdidas (Schwab et al., 2006).

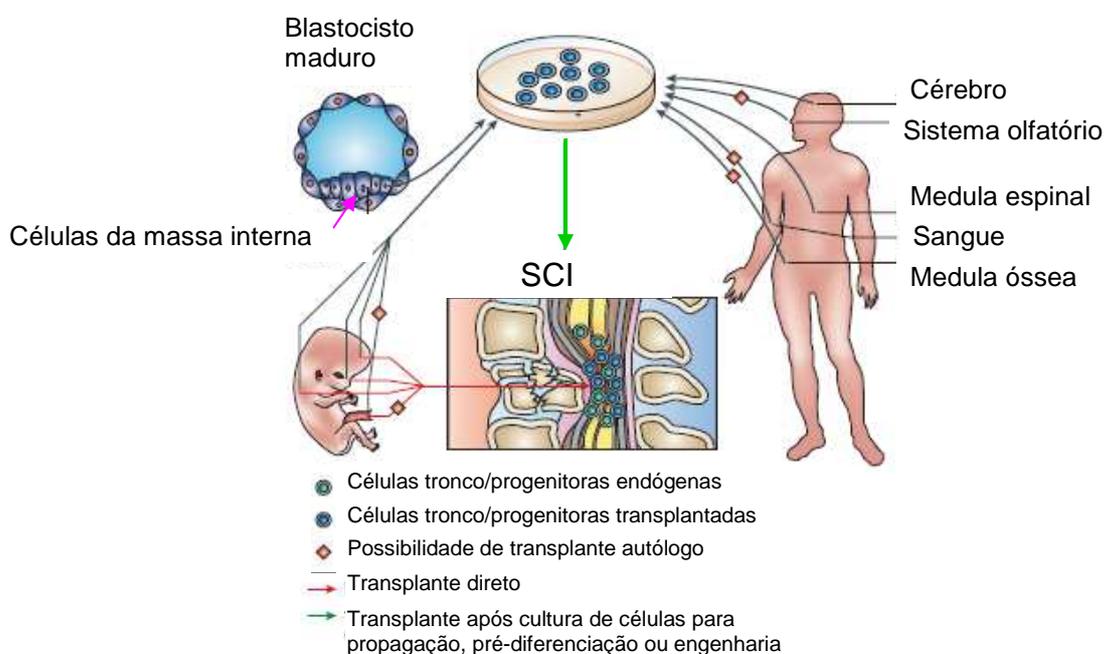


Figura 4: Fontes potenciais de células-tronco/progenitoras para transplante após SCI. Células-tronco/progenitoras podem ser coletadas em 3 estágios diferentes do desenvolvimento: da camada de células da massa interna no blastocisto maduro; do cérebro, medula espinal, sistema olfatório ou cordão umbilical do feto; do cérebro, medula espinal, sistema olfatório, medula óssea ou sangue do adulto. Cada uma destas populações pode ser propagada em cultura e modificadas geneticamente para produzir uma molécula de interesse, ou para diferenciar-se em um perfil celular específico. Extraído de Thuret et al, 2006.

1.3.2 Células-tronco exógenas

Uma estratégia óbvia para tratamento após lesão medular é a reposição das células neuronais perdidas. As células tronco embrionárias, totipotentes e pluripotentes, assim como as células-tronco adultas pluripotentes tem sido usadas em transplantes experimentais para investigar seu potencial em promover regeneração axonal. Os três maiores desafios com o reparo após lesão medular mediado por estas células são controlar a sobrevivência, a integração e a diferenciação das células transplantadas. Estas células devem promover recuperação funcional pela reconstrução da circuitária lesionada, remielinizar os axônios e incrementar a plasticidade e/ou a regeneração axonal (Thuret et al, 2006).

As linhagens adultas apresentam o benefício de poderem ser utilizadas em transplantes autólogos, o que dispensaria a imunossupressão, enquanto as células embrionárias só poderão ser utilizadas em transplantes heterólogos. Alguns experimentos têm sido realizados, em ratos e camundongos, sem uso de imunossupressores para avaliar o potencial regenerativo das várias linhagens de células-tronco (Reier, 2004; Cizkova et al., 2006).

Células mesenquimais são células pluripotentes derivadas da camada mesodérmica embrionária e retêm a habilidade de auto-renovação e transdiferenciação em vários tipos celulares. Estas células mesenquimais podem ser obtidas da medula óssea, tecido adiposo, sangue periférico e cordão umbilical (Eftekharpour et al., 2008). Na medula óssea, as células mesenquimais compreendem a população estromal não hematopoiética e são capazes de migrar, diferenciar e contribuir para a regeneração no sítio da injúria, em vários tecidos (Chamberlain et al., 2007). O transplante de células-tronco mesenquimais (MSCs) permite a recuperação funcional após acidente vascular cerebral (Chopp e Li, 2002), promove remielinização, assim como contribui para recuperação parcial da função

locomotora em modelos animais de lesão medular (Chopp et al., 2000; Hofstetter et al., 2002) e de lesão nervosa periférica (Lopes Pereira et al., 2006). Embora haja evidências crescentes que as células-tronco mesenquimais possam dar origem a células com características neurais *in vitro* (Kim et al., 2000) e *in vivo* (Chopp et al., 2000; Lee et al., 2003), ainda não está claro se sua influência dominante na recuperação da função após lesão medular seja devido a capacidade de diferenciação em perfil neural (Lee et al., 2003) ou a outras características, tais como, secreção de fatores neurotróficos (Yang et al., 2003), de fatores vasculares (Hamano et al., 2000) ou mesmo efeitos imunomodulatórios (Aggarwal e Pittenger, 2005).

As células-tronco progenitoras embrionárias são células multipotentes, derivadas da massa interna do blastocisto, e apresentam duas características: capacidade de auto-renovação indefinida e a habilidade para diferenciar em todos os tipos celulares de um organismo adulto (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000). Quando as ESC (do inglês, embryonic stem cells) são cultivadas aderidas em uma monocamada elas crescem como colônias indiferenciadas, porém se forem cultivadas não aderidas, elas se agregam formando uma estrutura 3D, chamada de corpo embrióide (EB, do inglês embryoid-body), os quais recriam uma estrutura semelhante ao embrião durante o desenvolvimento e inicia a diferenciação espontânea nas 3 camadas embrionárias (Zhou et al., 2005; Nishikawa et al., 2007).

O risco do emprego de células-tronco embrionárias indiferenciadas é a grande incidência de formações tumorais, este fato parece ser amenizado quando as células embrionárias são pré-diferenciadas e pelo menos parcialmente comprometidas com uma determinada linhagem, como descrito por Darabi e colaboradores (2008). Essa abordagem de pré-diferenciação antes do transplante parece ser bastante

promissora, e sua viabilidade têm sido testada para a diferenciação de células-tronco em células progenitoras do SN (Bibel et al., 2007), ou em célula específica, tais como, neurônio e oligodendrócito. Estes EB podem ser induzidos à diferenciação em alguns tipos celulares, tais como, progenitores neurais (Okada et al., 2004) ou oligodendrócitos (Keirstead et al., 2005). Muitos grupos têm estudado o destino destas células, proveniente de embriões de camundongo, que foram transplantadas após SCI em roedores adultos. Alguns, inclusive, com resultados apresentando discreta melhora funcional (Ogawa et al., 2002; Teng et al., 2002). Keirstead e colaboradores (2005) realizaram, em fase aguda após lesão, transplante de progenitores restrito de oligodendrócitos derivados de células-tronco embrionárias humanas em ratos adultos após 7 dias de SCI, e observaram aumento na mielinização e melhora locomotora do animal. Estas células também foram capazes de sobreviver, migrar por uma curta distância e se diferenciar em oligodendrócitos. Porém, quando este mesmo transplante foi realizado 10 meses após lesão, em uma lesão crônica, não houve mielinização ou qualquer melhora locomotora associada (Faulkner e Keirstead, 2005; Keirstead et al., 2005).

Animais experimentais têm apresentado, após transplante de células-tronco, algum grau de melhora funcional, porém não há evidências, até o momento, da capacidade de reconstrução estrutural (Reier, 2004; Keirstead et al., 2005; Cizkova et al., 2006). Apenas recentemente, houve evidências, utilizando microscopia eletrônica, da formação de sinapse entre célula implantada e neurônio hospedeiro maduro (Cumming et al., 2005; Schwab et al., 2006). Estes resultados confirmam o grande potencial terapêutico dos transplantes celulares após lesão medular, com várias linhagens de células-tronco, porém, parece haver um consenso de que um único tipo de abordagem terapêutica não será capaz de trazer a cura para a SCI.

Isto provavelmente dependerá do somatório de várias estratégias, em janelas terapêuticas adequadas, pra promover uma melhora cumulativa para o paciente (Reier, 2004, Thuret et al., 2006).

Segundo Schwab e colaboradores (2006), para que não haja informações ambíguas, tais como a descrição de resultados aparentemente discrepantes, com o emprego da mesma linhagem celular; há a necessidade de estabelecer padrões de avaliações uniformes que possam definir se, e qual linhagem de células-tronco sobrevivem, diferenciam e são funcionais após transplante. Neste trabalho pretendemos comparar os aspectos funcionais e morfológicos após transplante com linhagem celular exógena embrionária (embrionária de camundongo) e adulta (células mesenquimais de camundongo), em camundongos submetidos ao mesmo modelo de lesão.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial regenerativo da terapia celular, com diferentes linhagens de células-tronco, após lesão medular.

2.2 Objetivos Específicos

1. Estabelecer um modelo reprodutível e confiável de lesão compressiva em medula espinal de camundongos, e caracterizar morfológica e funcionalmente a lesão aguda e crônica de medula espinal.
2. Realizar o implante de células-tronco adultas e embrionárias em camundongos após lesão medular compressiva e realizar análise comparativa dos resultados obtidos no tratamento com estes dois tipos celulares.
3. Avaliar morfológicamente a preservação estrutural e a regeneração dos animais, submetidos a terapia celular e os diferentes grupos controles, quantificar e analisar estatisticamente estes dados.
4. Estabelecer parâmetros objetivos para análise funcional em animais com lesão medular e avaliar funcionalmente os animais submetidos à lesão de medula espinal e a diferentes estratégias terapêuticas, quantificar e analisar estatisticamente estes dados .
5. Avaliar a janela temporal ideal para tratamento com células-tronco embrionárias e mesenquimais de camundongos, comparando a recuperação funcional dos animais tratados na fase aguda e sub-aguda após lesão medular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos adotados para o uso dos animais estão de acordo com o “NIH Guide and Care of Laboratory Animals” e aprovado pela Comissão de Avaliação de uso de animais em pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ. Neste projeto utilizamos camundongos da linhagem C57Bl/6, fêmeas, adultas jovens, submetidos à cirurgia de laminectomia ao nível da vértebra T₉, e compressão extradural da medula espinal neste nível, com um clip vascular (ver figura 4), que promove importante comprometimento motor nas patas traseiras dos animais.

Os grupos experimentais foram submetidos, durante a fase aguda da lesão, às terapias celulares propostas. No pós-operatório eles foram separados em grupos, de acordo com seu tempo de sobrevivência e o diferente tratamento experimental. Estudamos também, grupos controles dos animais lesados.

Utilizamos, para quantificação e análise estatística, os cortes transversais em ML e os cortes semifinos em MET. Para estas técnicas analisamos no mínimo 5 animais em cada grupo experimental. Análise qualitativa complementar foi realizada a partir de cortes longitudinais em ML e cortes ultrafinos em MET, neste caso utilizamos um número mínimo de 5 animais por grupo.

Acompanhamos comparativamente a recuperação funcional destes animais, tratados ou apenas lesados, com avaliações funcionais periódicas e estes dados funcionais foram analisados estatisticamente e comparados entre os vários grupos para fornecer uma correlação da gravidade da lesão e sua recuperação após os tratamentos experimentais propostos.



Figura 5: Fotos do clip vascular utilizado para promover a lesão medular. Observe que a extremidade que realiza a compressão, é plana e tem aproximadamente 1mm de largura, distribuindo por igual a força de compressão por toda a lâmina e também apresenta uma espessura extremamente delicada que não dificulta o acesso ao canal vertebral .

3.1 Procedimento cirúrgico

Para anestesia administramos uma combinação de Ketamina (100 mg/ Kg) e Xilazina (15mg/Kg), por via intraperitoneal. A região dorsal, entre região cervical e lombar, foi tricotomizada (com creme depilatório) e desinfetada com água e álcool a 70%. Realizamos uma incisão na linha média posterior para expor os músculos paravertebrais, superficiais e profundos, e dissecamos a musculatura até visualizar a coluna vertebral de T₈ a T₁₀. Ao nível de T₉ dissecamos até expor bilateralmente as apófises transversas. A laminectomia foi realizada apenas nesta vértebra e a lesão medular foi produzida ao nível deste segmento pela compressão extradural, por 1 minuto, usando um clip vascular com 30g de força de oclusão (Kent Scientific Corporation, código INS14120, EUA). Após a compressão o tecido foi suturado em camadas, profundas e superficiais, com fio mononylon 6-0.

Durante a cirurgia houve a preocupação em manter os olhos do animal úmidos e protegidos da luz, para prevenir lesão na córnea e cegueira, que eventualmente poderia comprometer o seu desempenho motor. Imediatamente após a cirurgia administramos antibiótico tópico na incisão da pele (Ma et al., 2001), e realizamos a infusão subcutânea de soro fisiológico 0,9%, para repor o volume de

sangue perdido, acrescido de antibiótico sistêmico profilático (Flotril, 2,5 mg/Kg/d, por via subcutânea, Bayer) (Keirstead et al., 2005).



Figura 6: Foto do animal laminectomizado (A) e com o clip durante a compressão medular (B). Após 1 minuto o clip é retirado e a musculatura é suturada em camadas, profunda e superficial, e o animal é deixado aquecido durante a recuperação anestésica.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos individualmente para a recuperação pós-anestésica, retornando às gaiolas, com no máximo 3 animais, após plena recuperação, onde permaneceram por variados tempos de sobrevivência, de acordo com seu grupo experimental. A comida foi deixada dentro da gaiola durante 48 h após lesão e a água foi oferecida à vontade ao animal. Durante o período pós-operatório os ratos tiveram acompanhamento veterinário para manutenção do estado geral durante o seu período de sobrevivência e, quando necessário, era repetido o protocolo para hidratação ou profilaxia antibiótica. Manobras de esvaziamento da bexiga foram executadas, duas vezes ao dia, até retorno do controle da função vesical.

3.2 Grupos experimentais

Neste trabalho analisamos a repercussão estrutural, motora e funcional da lesão aguda (7º dia após-lesão) e crônica (56 dias após lesão) na medula espinal de camundongos.

O quadro abaixo detalha nossos grupos controles e experimentais:

GRUPOS CONTROLES	<ul style="list-style-type: none"> • Normal • Sham (apenas laminectomia ao nível de T₉) • SCI (lesado agudo e crônico, sem tratamento) • DMEM (lesado e tratado com DMEM, 10 minutos após lesão)
GRUPOS EXPERIMENTAIS	<ul style="list-style-type: none"> • EST (lesão aguda da medula espinal + células-tronco embrionárias de camundongos) • MSCT (lesão aguda da medula espinal + células-tronco mesenquimais de camundongos)

Quadro1: Grupos controles e experimentais

Para caracterização do modelo de lesão utilizamos um n de 33 animais para o grupo lesado (SCI, n= 16 para análise com 7 dias e n= 17 para análise com 56 dias após lesão) e de 15 animais para o grupo laminectomizado (SHAM).

Realizamos a análise comparativa entre os grupos com diferentes abordagens terapêuticas, e entre diferentes janelas temporais para o tratamento celular. Estes animais lesados foram divididos em grupos e subgrupos de acordo com o tratamento realizado. No grupo EST utilizamos um total de 17 animais (12 tratados 10 minutos após a lesão e 5 tratados 7 dias após a lesão), no grupo MSCT utilizamos um total de 18 animais (12 tratados 10 minutos após a lesão e 6 tratados 7 dias após a lesão), e no grupo DMEM utilizamos 5 animais tratados 10 minutos após a lesão. Avaliamos, neste modelo de lesão caracterizado por nós, a resposta regenerativa no SNC, e sua conseqüente melhora funcional, quando tratado com células-tronco de camundongo de diferentes linhagens (embrionárias e adultas mesenquimais).

3.3 Procedimento terapêutico

3.3.1 Células-tronco – preparo

3.3.1.1 Células embrionárias de camundongo

Os experimentos com células-tronco embrionárias murina foram realizados a partir de células doadas pela Dr. Lygia V. Pereira (USP) e Dr. Irina Kerkis (Butantan), em colaboração com o “Laboratório de Neurogênese e Diferenciação Celular - LANDIC”, do Instituto de Ciências Biomédicas, da UFRJ, coordenado pelo Dr Steven Rehen. As células foram cultivadas sobre fibroblastos murinos (MEFs, Hygeia Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia Aplicada, Brasil), inactivadas com mitomicina C (10 µg/mL. Sigma-Aldrich, Suíça) em DMEM/F12 suplementada com 15% de KSR (do ingles, knockout serum replacement) e 1,000 U/mL LIF (Chemicon) por 3 dias. Após este período, ESC foram dissociadas com TrypLE™ (Invitrogen) e plaqueadas em DMEM/F12 suplementada com 15% soro fetal bovino (FBS) com LIF (chamado meio de EB) por dois dias até os EB serem formados. EB foram tratados com 2µM de ácido retinóico (RA, Sigma) por 4 dias com troca o meio diariamente (Okada et al., 2004). Antes do transplante os EB foram enzimaticamente dissociados com TrypLE™ seguido pela marcação com CellTracer®. A diferenciação induzida pelo AR foi avaliada por imunocitoquímica (para nestina) em EB, fixados com paraformaldeído 4% e cortados em criostato (10µm).

rpm/5min. Após isso, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado DMEM ao “pellet” de células. As células foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^7 células numa garrafa de 25 cm^2 , para uma cultura primária total. A cultura foi purificada por duas passagens, e ficou com menos macrófagos e mais células estromais. Após a terceira passagem, realizou-se a tripsinização, contagem das células e injeção na medula espinal. Células excedentes, da mesma garrafa das que foram injetadas por nós, foram replaqueadas e estimuladas à diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos.

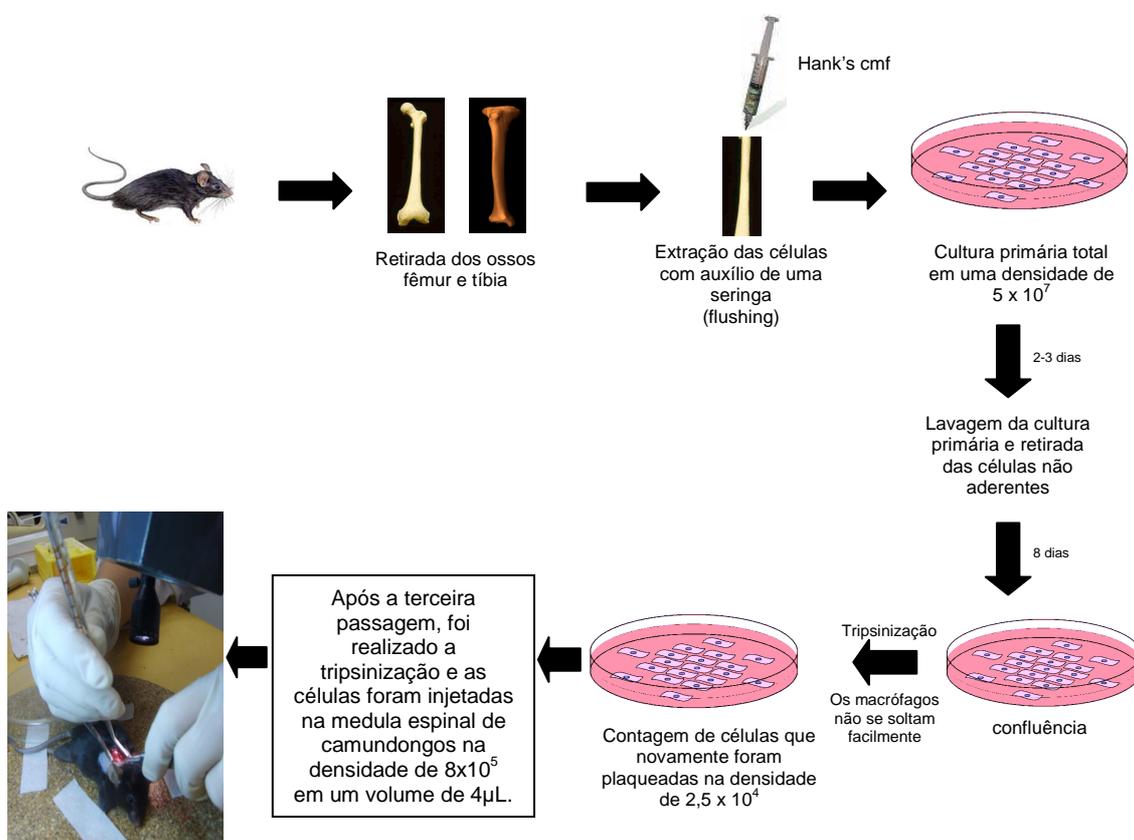


Figura 8: Esquema de preparo das células mesenquimais. Extração e preparo das células-tronco mesenquimais de camundongo GFP⁺ para transplante.

3.3.2 Células-tronco – administração

Os animais lesados receberam as células-tronco embrionária de camundongo, pré-tratadas com ácido retinóico (EB), na concentração de 8×10^5 células/ 2 μ l, ou as células-tronco mesenquimais de camundongo GFP⁺, na concentração de 8×10^5 células/ 4 μ l, por injeção intra-medular no plano sagital mediano (lateral ao grande vaso sanguíneo central presente na região dorsal da medula espinal) na área do epicentro da lesão, 10 minutos após SCI, com uma seringa de Hamilton (10 μ l), utilizando uma agulha adaptada com calibre de 31G (0,8x0,25mm). Realizamos também tratamento com estas células-tronco, na mesma concentração, 7 dias após a lesão, para análise da janela temporal de tratamento. Após a injeção, os procedimentos de sutura e pós-operatório foram realizados como nos demais grupos. As células foram transplantadas em meio de cultura DMEM, por isso realizamos 1 grupo controle, submetido aos mesmos procedimentos cirúrgicos e tratado com injeção apenas do meio de cultura.

Fizemos também grupos tratados, com as duas linhagens de células-tronco, 7 dias após a lesão. Estes animais foram anestesiados, a medula espinal foi novamente exposta, e o procedimento para a injeção intra-medular e pós-operatório foi realizado segundo o protocolo pré-estabelecido.

3.4 Avaliação da recuperação motora após lesão de medula espinal - Análises funcionais

Realizamos, em todos os grupos experimentais, avaliações periódicas da função motora a fim de graduar o distúrbio motor e avaliar o desempenho na performance locomotora destes animais. Utilizamos para isso os seguintes testes:

- Registro em vídeo no labirinto de campo aberto para acompanhar a melhora da mobilidade global com avaliação da distância percorrida e velocidade de deslocamento durante os diferentes tempos de sobrevivência.
- Teste de campo aberto (Basso et al., 1995) e a escala Basso de avaliação locomotora para camundongos (BMS, Basso et al., 2006),
- Teste de impressão dos passos para avaliação dos seguintes parâmetros: padrão de passos, comprimento e largura dos passos (Kunkel-Bagden et al., 1993; Gonzalez et al., 2003)

Todos os animais foram adaptados adequadamente aos procedimentos dos vários testes e as manipulações por um período de ao menos 2 semanas, na fase pré-operatória. Quando estes não apresentavam mais sinais de medo, tais como, eliminação de fezes e/ou urina constante, piloereção, ruídos ou alterações abruptas do ritmo respiratório ao toque, eram realizados o pré-teste para gerar os parâmetros de normalidade do animal nos testes. O campo aberto e a escala BMS foram empregados nos seguintes momentos: pré-teste antes da lesão, 1 dia após lesão e avaliações semanais que se estenderam até o termo do período de observação do seu grupo. O teste de impressão dos passos foi realizado antes da cirurgia e 56 dias após a lesão.

3.4.1 Análise da Mobilidade Global

O teste para análise da mobilidade global foi desenvolvido durante este trabalho, na fase de caracterização da lesão medular compressiva (Marques et al., 2008). Este teste foi desenvolvido para promover uma análise quantitativa objetiva da motricidade global, a partir da avaliação da distância percorrida e velocidade de deslocamento durante os diferentes tempos de sobrevivência. Por ser um teste objetivo não sofre interferências do avaliador, portanto não há necessidade de treino prévio. A captura de imagem foi feita com WebCam (KMEX, EUA) utilizando o software livre K3CCDTools (5 frames por segundo). Filmamos o animal andando no campo aberto, por 1 minuto. Realizamos 3 registros por animal a cada semana e a média da velocidade obtida a partir destas 3 tomadas foi plotada para análise estatística para cada animal do grupo, naquele dado tempo. Estabelecemos a partir destes valores por animais a média dos grupos, as quais foram utilizadas para análise comparativa entre os grupos a cada tempo estudado. Utilizamos o software Image J (National Institute of Health, EUA, Kunkel-Bagden et al., 1993) para analisar as imagens e realizar as medidas específicas da distância percorrida. O focinho do animal foi utilizado como ponto de referência para o deslocamento do animal.

3.4.2 Teste de campo aberto e emprego da Escala Basso para avaliação locomotora de camundongos

A performance locomotora foi analisada usando a escala Basso para avaliação locomotora de camundongos (BMS, Basso et al., 2006), no teste de campo aberto, por que esta escala demonstrou ser mais sensível e seguro que a

escala BBB (Basso, Beattie e Bresnahan; Basso et al., 1995) para avaliação locomotora de rato, com um intervalo de confiança de 0.5 (Basso et al., 2006). Os animais foram avaliados com esta escala conforme previamente descrita por Basso e colaboradores (2006), durante 4 minutos, e as avaliações obedeceram sempre os mesmos critérios previamente estabelecidos e treinados no período pré-operatório. Brevemente, o BMS é uma escala de 9-pontos que provê uma indicação grosseira da habilidade locomotora, e determina as fases de recuperação locomotora (ver quadro 2) e características da locomoção.

Fases de recuperação da lesão	Ítems a serem avaliados
Recuperação inicial	Movimento articular
Recuperação intermediária	Posicionamento da pata e suporte de peso
Recuperação final	Passos, coordenação membro anterior e membro posterior posição predominante da pata durante deslocamento anterior, estabilidade de tronco e posição da cauda.

Quadro 2: Fases da recuperação locomotora. Ítems a serem avaliados em cada fase

A fase inicial da recuperação compreende a resolução da paresia e/ou da paralisia, progredindo de nenhum movimento de tornozelo até movimento amplo de tornozelo, com um escore entre 0 e 2. Posicionamento plantar e o desenvolvimento de passos acontecem na fase intermediária da recuperação, com escore de 3-4. Na fase final da recuperação, pontua-se o posicionamento das patas, a coordenação entre patas dianteiras e traseiras e a estabilidade de tronco (escores entre 5 e 8).

DN: _____ ANIMAL: _____ DATA: _____ DPO: _____ D: _____ E: _____

Âng Mov		Posição Plantar				PASSO				Coord	Posição Pata				Instabilidade de Tronco			Cauda
D	E	S/Sup de Peso		C/Sup Peso		Dorsal		Plantar			Cont ini		Erguido		Severa	Mod	Norm#	
		D	E	D	E	D	E	D	E		D	E	D	E				
Ø	Ø	D	E	D	E	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø*	I	I	I	I	Eventos▲:	Instance:	Abaixado	
D	D					O	O	O	O	some	E	E	E	E	Hip hits	Moderada	Sobe/desce	
A	A					F	F	F	F	most	P	P	P	P	Escoliose	Severa	Elevado	
						C	C	C*	C*						Espasmos			

Figura 9 – Ficha de avaliação da escala BMS. Modelo de planilha utilizado para anotação dos dados observados durante a realização do teste de avaliação locomotora dos animais pela escala BMS. Extraído e traduzido de Basso et al., 2006).

Escores de 9 indicam a mobilidade locomotora normal, com estabilidade de tronco e performance refinada. As avaliações foram feitas por dois observadores cegos para os grupos analisados. O escore individual foi obtido a partir da análise dos dados registrados na tabela de avaliação da BMS (figura 9) e de acordo com os critérios de escore (ver quadro 3). O escore de cada pata traseira foi registrado como a média por animal (patas direita e esquerda) para obter um escore do BMS para cada camundongo, e então a média do grupo foi calculada. Para estes testes, os animais foram avaliados antes da lesão, 1 dia após, e então semanalmente até 8 semanas pos-lesão.

Quadro 3 – Critérios para Escore da Escala BMS

Fases da recuperação	Escore da BMS
Inicial	(0) nenhum movimento de tornozelo (1) movimento de tornozelo discreto (2) movimento de tornozelo amplo
Intermediária	(3) posicionamento plantar da pata com ou sem suporte de peso – OU – passos dorsais, ocasionais, freqüentes ou constante, sem nenhum passo plantar
Final	(4) Passos plantares ocasionais (5) Passos plantares, de freqüente a constante, sem nenhuma coordenação – OU - passos plantares, de freqüente a constante, com alguma coordenação, e a posição da pata rodada no contato inicial e ao ser levantada (6) Passos plantares, de freqüente a constante com alguma coordenação, e a posição da pata paralela no contato inicial – OU - passos plantares, de freqüente a constante, maior coordenação, e a posição da pata rodada no contato inicial e ao ser levantada (7) Passos plantares, de freqüente a constante com maior coordenação, e a posição da pata paralela no contato inicial e rodada ao ser levantada – OU - passos plantares, de freqüente a constante, maior coordenação, a posição da pata paralela no contato inicial e ao ser levantada, com instabilidade de tronco severa (8) Passos plantares, de freqüente a constante com maior coordenação, a posição da pata paralela no contato inicial e ao ser levantada e instabilidade de tronco moderada – OU - passos plantares, de freqüente a constante, maior coordenação, a posição da pata paralela no contato inicial e ao ser levantada, com estabilidade de tronco normal e cauda abaixada ou oscilando nas posições abaixada e erguida (9) Passos plantares, de freqüente a constante com maior coordenação, a posição da pata paralela no contato inicial e ao ser levantada e cauda sempre erguida

Extraída e traduzida de Basso et al., 2006.

3.4.3 Teste de impressão dos passos

Utilizamos o teste de impressão dos passos conforme descrito por Kunkel-Bagden e colaboradores (1993), para obter os seguintes itens para avaliação: comprimento dos passos (CP, patas direitas - RSL e patas esquerdas - LSL), base de suporte (BS) (Kunkel-Bagden et al., 1993; Gonzalez et al., 2003). Os membros anteriores e posteriores dos animais foram pintados com tinta não tóxica de cores diferentes (patas dianteiras em vermelho e traseiras em azul), e a impressão dos passos foi feita sobre uma pista de papel, enquanto o animal caminhava em direção a um túnel escuro. A impressão das patas dianteiras, em vermelho, foi usada para padronizar a direção da locomoção, e para inferir a coordenação entre patas dianteiras e traseiras, através da quantificação do número de passos dados com os membros anteriores e posteriores (Ma et al., 2001).

3.5 Preparo do espécime – perfusão, fixação e dissecação

Os animais cujas medulas espinhais seriam processadas para microscopia óptica e microscopia eletrônica foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (30 mg/Kg) por via intraperitoneal. Após comprovação do estado de anestesia profunda, os camundongos foram posicionados e imobilizados sobre uma placa de cortiça, com as patas dianteiras e traseiras esticadas, para proceder à perfusão intracardiaca. A perfusão foi feita através de um “scalp” introduzido no ventrículo esquerdo, após secção do diafragma e rebatimento do gradil costal. Imediatamente ao início da infusão com o fixador, o átrio direito foi cortado para permitir o escoamento do sangue e fixador. Ao “scalp” foi acoplada uma seringa com o fixador,

que permitiu um fluxo contínuo e rápido deste. A solução fixadora utilizada na perfusão foi paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4.

Após a perfusão, dissecamos a medula espinal em tamanho adequado à técnica a ser utilizada (1mm a 2 cm) e pós-fixamos, durante a noite, em solução fixadora de paraformaldeído a 4% acrescido de glutaraldeído a 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, o que permitiu melhor penetração da solução fixadora no tecido utilizado. O segmento de 1mm da medula espinal contendo a área que sofreu o esmagamento e as regiões rostral e caudal a este segmento foram nosso foco de estudo. No dia seguinte teve início o processamento para inclusão em parafina ou OCT, no processamento para ML, ou em resina POLYBED, no processamento para MET.

3.6 Processamento para Microscopia de Luz e colorações

Para inclusão em parafina, o material foi lavado em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e água destilada, desidratado em concentrações crescentes de álcool (um banho de 1 hora nas concentrações de 70, 80 e 90%, e dois banhos de 1 hora no álcool absoluto), diafanizado em xilol (2 banhos seqüenciais por 1 hora cada), impregnado em parafina (dois banhos de parafina à 56° C em estufa) e incluído, em posição transversal ou longitudinal, em parafina nova. Estes blocos foram cortados, longitudinal ou transversalmente, no micrótomo (45 Rotary microtome, Lipshaw MFG. Co), na espessura de 10 µm, e os cortes foram recolhidos em lâminas gelatinizadas (SIGMA). Para inclusão em OCT, o material foi lavado em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, crioprottegido em concentrações crescentes de sacarose (5, 10 e 20%, 30 minutos cada, e 30% durante a noite) e preparado por criocongelamento para ML. Estes blocos foram cortados transversalmente, no criostato (Leica, EUA),

na espessura de 20 μm , e os cortes foram recolhidos em lâminas gelatinizadas (SIGMA). Utilizamos os cortes longitudinais para análise qualitativa da lesão, e os cortes transversais para posterior análise quantitativa e imunohistoquímicas.

Utilizaremos a coloração de Hematoxilina-eosina (HE) para visualizar a morfologia do tecido. Esta coloração bicrômica permite visualizar núcleos e retículos no tom arroxeado e elementos citoplasmáticos e da matriz extracelular em tons avermelhados ou rosados. A coloração de Kluver-Barrera (Luxol Fast Blue + Cresil violeta) foi utilizada para avaliação da área de desmielinização e para avaliar os corpos celulares neuronais, uma vez que o Luxol Fast Blue permite evidenciar a mielina e as células da glia em diversos tons de azul e o cresil violeta cora a substância de Nissl em tom violeta.

3.6.1 Análise morfométrica

Para caracterização da reprodutibilidade e gravidade do nosso modelo de lesão medular, nos grupos SHAM, SCI, EST e MSCT (n=5 cada), usamos dois tipos de quantificação: a quantidade de substância branca preservada (Ma et al., 2001) e o número de fibras preservadas na periferia desta lesão.

3.6.1.1 Quantificação da substância branca preservada

Foram feitos cortes transversais seriados, na espessura de 10 μm , compreendendo as regiões rostral e caudal ao epicentro da lesão, e foram coletados 1 a cada 5 cortes (cada corte com um intervalo de 50 μm de distância entre eles). As lâminas foram coradas com Luxol Fast Blue (LFB), cobrindo uma distância total de

1,5cm da medula espinal, e visualizadas em um microscópio de luz (Zeiss Axioscop 2 Plus). O epicentro da lesão foi determinado pela secção que apresentou menor quantidade de substância branca preservada. A quantidade de substância branca preservada foi calculada como área total da medula espinal menos a área não marcada pelo LFB, e foi descrita em área por mm^2 , como percentagem da área total em relação à do epicentro da lesão. A integridade da substância branca, e a densidade da sua coloração foi um marcador para o limite da área da lesão.

3.6.1.2 Quantificação das fibras nervosas preservadas

Para a quantificação das fibras nervosas preservadas, cortes semifinos (500nm) foram obtidos do epicentro da lesão, em todos os grupos analisados, corados com azul de Toluidina, e visualizadas usando um microscópio Zeiss Axioscop 2 Plus. Imagens digitais com aumento de 1,000 vezes foram feitas de campos na periferia da substância branca. Foram fotografados seis campos por animal, nas regiões anteriores (direita e esquerda) e laterais (anterior e posterior, direita e esquerda).

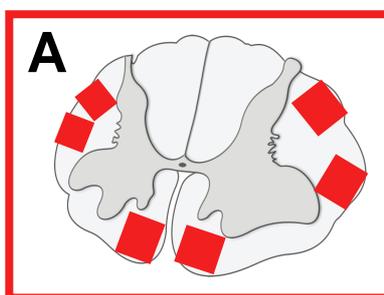


Figura 10: Esquema para quantificar as fibras preservadas. Esquema dos 6 campos fotografados, em aumento de 1000x, para quantificação das fibras mielinizadas normais na substância branca da medula espinal.

Fibras mielinizadas normais foram contadas por um avaliador cego aos grupos analisados. Esta quantificação foi realizada usando o programa Image J (National Institute of Health, EUA). Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad Prism 4.0 (graphPad software, EUA), e os testes one-way ANOVA e Tukey como *post hoc*; resultados foram expressos como média±SEM; valor de p foi significativo quando ≤ 0.05 .

3.6.2 Imunohistoquímica

Realizamos imunomarcção à microscopia de luz, para rastrear a proteína GFAP (para filamento intermediário de astrócito, Sigma, diluição 1:200). Utilizamos CY3 (1:1000, Sigma, USA) ou Alexa 488 (Molecular Probes, EUA) como segundo anticorpo. Utilizamos DAPI (1:2000, Sigma, EUA) para marcar os núcleos. Foram feitos controles negativos, omitindo-se o anticorpo primário, para todas as reações de imunohistoquímica.

3.6.3 Técnica de marcação do terminal desoxinucleotidila uridina-transferase (TUNEL)

A marcação citoquímica com TUNEL é sensível para detectar a fragmentação do DNA no núcleo, e funciona como um indicativo de apoptose celular. Utilizamos o protocolo de marcação recomendado pelo fabricante do Kit (Apoptosis Detection Kit S7100, Chemicon International) para detectar apoptose durante a caracterização da lesão, nos grupos SHAM e SCI.

3.7 Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Rotina

A medula espinal foi manualmente clivada em segmentos de 1 mm para iniciar o processamento. Este material pós-fixado seguiu o protocolo de preparo e inclusão de rotina para a resina EPON (POLYBED). Analisamos a região do epicentro da lesão. Nossa análise foi realizada a partir de cortes transversais, semifinos e ultrafinos, desta região da medula espinal. Os blocos obtidos foram manualmente aparados para formar a pirâmide com base trapezoidal. Obtivemos, no ultramicrotomo (MT 6000 XL - RMC), cortes transversais semifinos (500nm) que foram coletados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina, observados ao microscópio de luz e utilizados para quantificação de fibras nervosas. E obtivemos os cortes ultrafinos (60-90 nm) que foram coletados em grades de cobre (300 mesh) para análise ultraestrutural. Estas grades foram contrastadas em solução aquosa de acetato de uranila 5% (30 minutos) e citrato de chumbo (10 minutos). Após contrastação, foram observadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900). As imagens adquiridas ao ME foram digitalizadas com auxílio de um Scanner para negativos (EPSON, 600dpi).

3. 8 Análise dos resultados e quantificação dos dados

As imagens digitais adquiridas ao microscópio de luz (Axioscop 2 Plus Zeiss, câmera AxioCam MRC, com o programa AxioVision 4.5), e os resultados obtidos nos outros recursos de testes e avaliações foram reunidos para análise qualitativa e quantitativa dos resultados utilizando o software de estatística Prisma 4 (GraphPad Inc.).

Os dados para análise quantitativa foram extraídos utilizando o programa Image J (National Institute of Health, EUA). Os resultados desta quantificação foram analisados estatisticamente usando o software Prisma 4 (GraphPad Inc.) e os testes one-way ANOVA e Tukey como *post hoc* foram utilizados objetivando comparar os resultados e fornecer respostas confiáveis às nossas perguntas.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da lesão: Análise Funcional

4.1.1 Análise de Mobilidade global

O grupo Sham não mostrou nenhuma alteração no comportamento locomotor após a laminectomia (figura 11A-D). Eles mantiveram padrão exploratório constante e velocidade locomotora normal (15.80 ± 1.166 cm/s, média \pm SD, Figura 11I) durante o período de avaliação. Todos os animais do grupo SCI apresentaram paralisia e sério comprometimento dos seus movimentos após lesão. Assim que eles puderam se mover, usaram as patas dianteiras para locomoção. No dia seguinte à cirurgia, o grupo SCI, apresentou movimentação restrita ao redor do seu próprio eixo (figura 11E), utilizando apenas o espaço peri-pessoal durante sua exploração. Sua velocidade locomotora aumentou progressivamente (5.581 ± 0.871 cm/s, média \pm SD), durante o período experimental analisado, mas não alcançou o padrão de normalidade. Com 7 dias após a lesão, a restrição da tarefa exploratória persistia no grupo SCI (figura 11F), porém alguma recuperação espontânea foi evidente até o 21º dia após lesão. Entre o 21º e o 56º dia após a lesão (figura 11G - H), os animais do grupo SCI mostraram aparente estagnação da recuperação espontânea, e não apresentaram melhora significativa da mobilidade global após este período. Com 8 semanas após lesão, atrofias dos músculos de patas traseiras e deformidades estruturais, tais como escolioses, foram evidentes nestes animais. Os animais não mostraram nenhuma melhora significativa adicional durante o resto do período

experimental. Os resultados estatísticos, comparativos entre os grupos estudados são apresentados como média \pm SD, e plotados em um gráfico de linha (figura 11I).

4.1.2 Teste do campo-aberto e BMS

Todos os camundongos usados neste estudo mostraram um escore máximo na BMS (escore 9) durante a avaliação antes da lesão. Os resultados estatísticos, comparativos entre os dois grupos estudados, são apresentados como média \pm SD, e plotados em um gráfico de linha (figura 11J). O grupo SHAM não apresentou nenhum déficit óbvio depois da recuperação da anestesia, e exibiu locomoção normal ao longo do período de avaliação (BMS escore 9). Imediatamente após a lesão medular, o grupo SCI apresentou paralisia flácida sem movimento de patas traseiras (PT), e manteve este padrão no dia seguinte à cirurgia (BMS escore 0). Estes animais recuperaram o movimento discreto de tornozelo durante a primeira semana após lesão, até o 10^o dia (BMS escore 1), e depois apresentou melhora até alcançar passos. Durante as primeiras 3 semanas, o grupo SCI recuperou movimento de tornozelo extenso (BMS escore 2), e alguns animais realizaram passos dorsais (BMS escore 3). Entre a 5^a e a 8^a semana após lesão, eles demonstraram freqüente passos dorsais (BMS escore 3) ou passo plantar ocasional (BMS escore 4), mas sem qualquer coordenação. Houve diferenças marcantes entre os grupos. O grupo SHAM manteve o escore máximo na BMS (8.981 ± 0.056 , média \pm SD) durante todo o período de avaliação, enquanto que apenas alguns animais do grupo SCI chegaram à fase intermediária da BMS (2.037 ± 1.198 , média \pm SD), e não houve nenhuma melhora funcional adicional (figura 11J). Foi observada recuperação assimétrica nos camundongos do grupo SCI, com escores diferentes

entre os lados esquerdo e direito. Semelhante aos investigadores da BMS, nós achamos comportamentos distintos que indicavam instabilidade de tronco, tais como escolioses, espasmos extensores ou flexores, e deslocamento lateral do tronco com modificação no posicionamento das patas durante o passo. Contrações contínuas bilaterais nas PT, semelhante a tetania, foram amplamente visto em animais do grupo SCI que tinham deixado de dar passos, e este fato reduziu o desempenho locomotor do animal.

4.1.3 Teste de impressão plantar

Nós pintamos as patas dianteiras e traseiras dos animais, com tinta não tóxica, para fazer uma comparação do padrão de passos entre os grupos SHAM e SCI. Antes da lesão, todos os animais mostraram coordenação normal entre as patas dianteiras e traseiras. O grupo SHAM manteve uma impressão de passo com padrão normal, mas no grupo SCI foi impossível detectar impressão plantar (figura 11K). Ocasionalmente, uma discreta impressão azul, correspondente a pata traseira, foi vista, por causa do arrastar dos primeiros dedos das patas posteriores (dados não mostrados), mas nunca uma impressão plantar perfeita.

4.2 Caracterização da lesão: Análise Morfológica

4.2.1 Microscopia de luz

Figure 12A e B mostram uma fotografia do clipe vascular usado para promover a lesão (A) e uma visão esquemática do clipe no local da lesão na medula

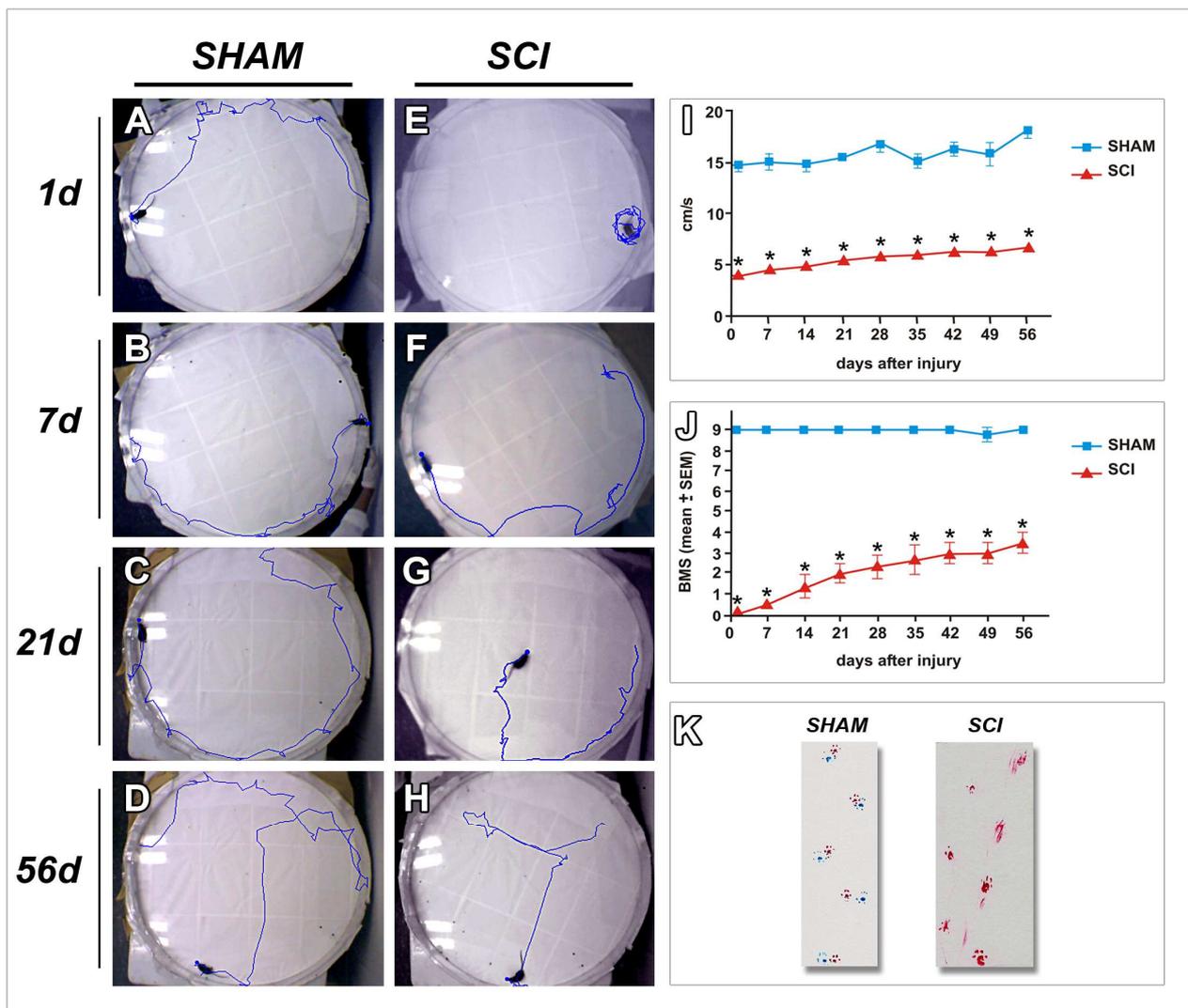


Figura 11 – Caracterização da lesão - Análises Funcionais. (A-I) Progressão da Mobilidade Global após cirurgia. Progressão do grupo SHAM (A-D) versus grupo SCI (E-H) em diferentes tempos após a cirurgia (1 dia A e E, 7 dias B e F, 21 dias C e G, 56 dias D e H). (I) Gráfico de linha representando o progresso de mobilidade global entre os grupos SHAM e SCI. Cada ponto representa a média do grupo, $p < 0.001$. (J) Gráfico de linha representando o escore comparativo BMS, entre os grupos SHAM e SCI, $p < 0.001$. (K) Análise qualitativa pelo teste de impressão plantar, patas dianteiras em vermelho e patas traseiras em azul. O grupo SHAM manteve coordenação de passo, enquanto o grupo SCI não mostrou nenhuma impressão das patas posteriores. Mobilidade global e BMS, * = $p < 0.001$. Legendas dos grupos: SHAM – laminectomia, SCI – lesado. Total de animais analisados SHAM = 15, SCI = 33.

espinal (B). O grupo SHAM apresentou a medula espinal com citoarquitetura normal ao exame macroscópico e microscópico. Observamos clara delimitação entre substância branca e cinzenta, com celularidade normal (figura 12C, F e H). No grupo SCI, o espalhamento da lesão na medula espinal foi claramente visível em cortes longitudinais, mostrando área do epicentro e áreas ao redor. Imediatamente após a lesão foi possível identificar áreas de hemorragia no epicentro da lesão, com o aumento no volume da medula espinal, mas sem lesão na dura-mater (dados não mostrados). Também foi difícil discernir os limites entre substância branca e cinzenta no epicentro da lesão, e o tecido ao redor apresentou alterações histológicas. Com 7 dias após a lesão, o aumento da densidade celular, o edema e as cavitações eram mais evidentes; estas alterações ainda eram evidentes 56 dias após a lesão, em sua fase crônica (figuras 12, 13 e 14). Estas alterações estavam presentes em ambos, substância branca e cinzenta. Pequenas cavidades eram rodeadas por grupos de células pequenas (figura 12I). E estas cavidades se assemelhavam aos cistos achados em outros modelos animais de lesão medular (Ma et al., 2001; Camand et al., 2004). Com 56 dias após lesão, a degeneração de neurônios motores e desmielinização difusa eram mais evidentes (figuras 12 e 13). Cortes longitudinais mostraram desorganização estrutural no epicentro da lesão, com evidente cicatriz glial e desmielinização difusa dos tratos ascendentes e descendentes (figura 12D, E). Cortes transversais mostraram desmielinização, predominante nos funículos dorsal e lateral, mas pequenas cavidades foram evidentes em todas as regiões da substância branca (figura 13B, C e E).

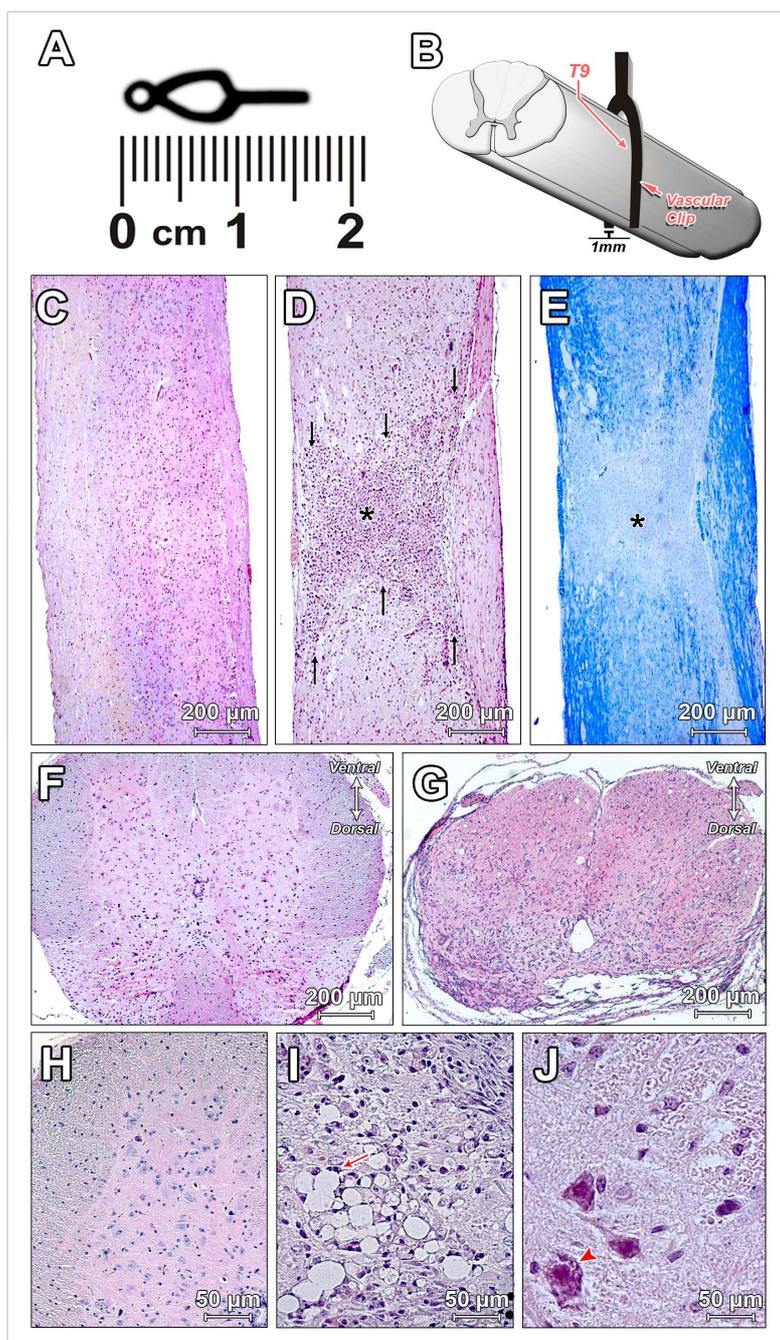


Figura 12: Caracterização da lesão - Análise Morfológica. (A) esquema do clipe vascular utilizado. (B) Esquema da compressão da medula espinal pelo clipe, ao nível de T9. (C-E) Cortes longitudinais da medula espinal corados com HE (C, D) e KB (E). C - grupo SHAM, com 56 dias após cirurgia, apresentando morfologia normal. D - Grupo SCI, com 56 dias após lesão, mostrando aumento da celularidade (cicatriz glial, delimitada pelas setas) na área da lesão. E - Grupo SCI, com 56 dias após lesão, apresentando área de desmielinização. (F-J) Cortes transversais do grupo SHAM, ao nível de T9 (F e H) e do grupo SCI (G, I e J). Com 56 dias após cirurgia, o grupo SHAM apresentou preservação da citoarquitetura, enquanto no grupo SCI foi difícil discernir limites entre substância branca e cinzenta (G). (I) Na lesão aguda, as microcavitações, rodeadas por pequenas células (seta), foram mais evidentes, enquanto com 56 dias após a lesão (J), a morte neuronal (cabeça de seta) foi mais marcante. asterisco = epicentro da lesão. Legendas dos grupos: SHAM - laminectomia, SCI - lesado. Total de animais analisados SHAM = 10, SCI = 12 com lesão aguda e 13 com lesão crônica.

4.2.2 Quantidade de substância branca preservada

A quantificação da substância branca preservada mostrou uma perda da área corada com LFB no grupo SCI ($p < 0.001$), como mostrado na figura 13D. A substância branca preservada foi descrita como uma porcentagem da quantidade de substância branca poupada na área da lesão. O grupo SHAM mostrou distribuição estrutural normal (figura 13A), enquanto que o grupo SCI apresentou uma distribuição alterada, com cavitações evidentes na fase aguda da lesão (figura 13B e E), e desmielinização na fase crônica (figura 13C). Nesta fase crônica, também foi possível observar perda de neurônios motores no corno anterior (figura 13F).

4.2.3 Imunomarcção e reação para TUNEL

O grupo SHAM mostrou celularidade normal, evidente através da marcação com DAPI, enquanto o grupo SCI apresentou aumento da celularidade. Provavelmente, este aumento está relacionado com a astrogliose, como mostrado com a marcação para GFAP (figura 14, A-D). Morte celular por apoptose foi avaliada por marcação com TUNEL. O grupo SHAM não apresentou nenhuma célula TUNEL positiva na área de laminectomia, enquanto o grupo SCI mostrou muitas células TUNEL positivas no epicentro da lesão (figura 14, E, F).

4.2.4 Cortes semifinos e ultrafinos

Cortes semifinos do grupo SHAM apresentaram fibras nervosas organizadas em fascículos com células de glia ao redor delas (figura 15A). No grupo SCI, fibras

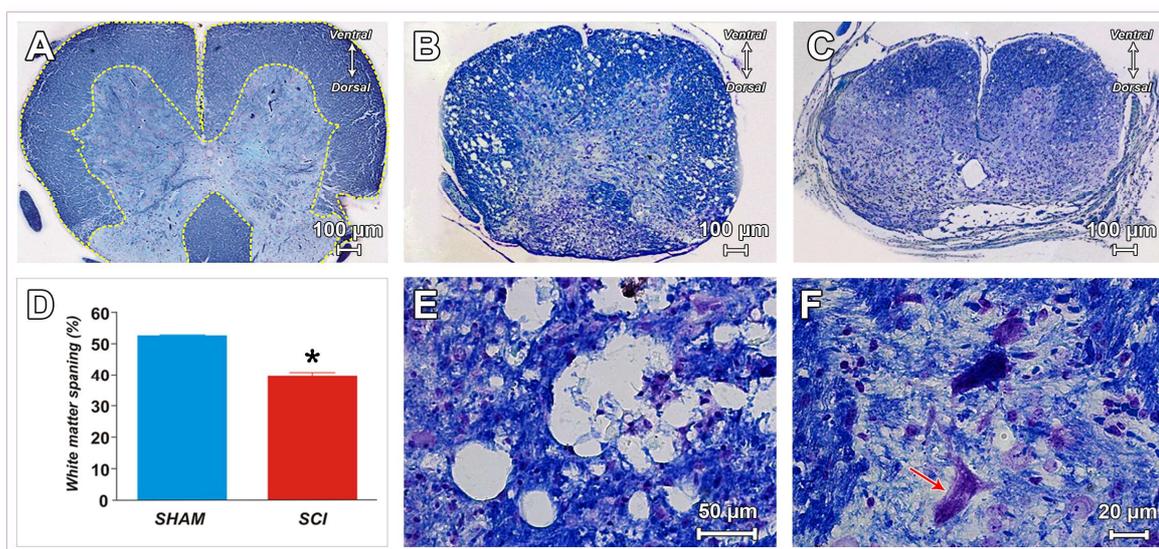


Figura 13: Substância branca preservada. Cortes transversais, coradas com KB (A-C, E e F). O grupo SHAM apresentou distribuição normal da substância branca (A, área azul escuro entre as linhas pontilhadas ilustra a área de substância branca que foi quantificada). No grupo SCI, 7 dias após lesão, (B e E) as pequenas cavitações na área de substância branca e edema eram predominantes, enquanto com 56 dias após lesão, a desmielinização (C) e a perda neuronal (F, seta) eram mais evidentes. Observe o espessamento das meninges (C), principalmente na região dorsal. Gráfico de barra (D) mostra os resultados da morfometria dos cortes transversais corados com LFB, proveniente dos dois grupos estudados. A quantidade de substância branca preservada revelou diferenças significativas entre os grupos SHAM e SCI (* $p < 0.001$). Legendas dos grupos: SHAM – laminectomia, SCI – lesado. Total de animais analisados para a quantificação SHAM = 5, SCI = 5 com lesão crônica.

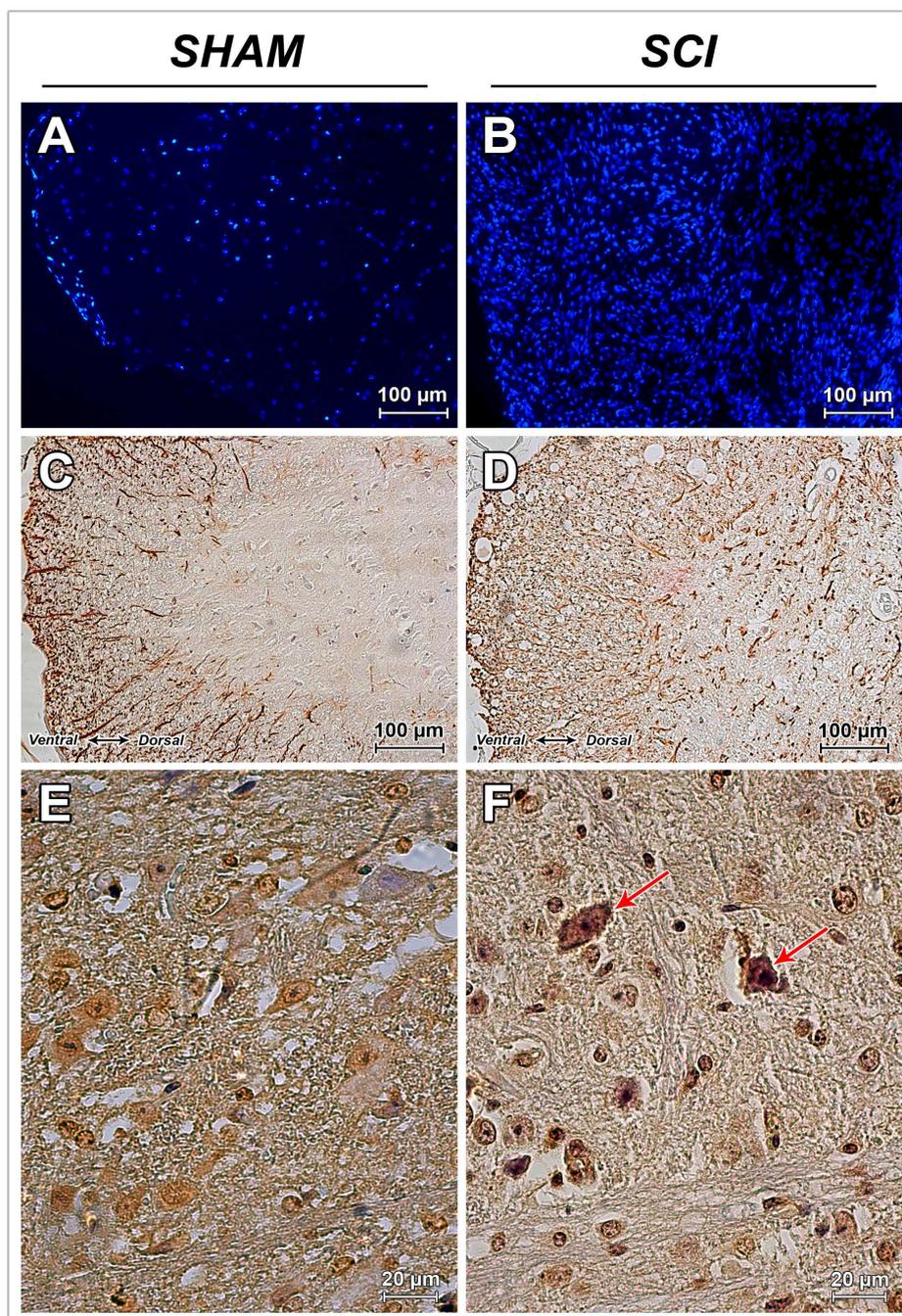


Figura 14: Marcação com DAPI (A, B), GFAP (C, D) e TUNEL (E, F). Na marcação com DAPI fica evidente o aumento da celularidade, 56 dias após lesão, quando comparamos o grupo SHAM (A) com o grupo SCI (B), provavelmente, este aumento celular esteja relacionado com a astrogliose reativa, como observado no aumento da expressão de GFAP, em C (SHAM) e D (SCI). Morte de células por apoptose (setas) foi detectada pela reação para TUNEL no epicentro da lesão (E, F). Legendas dos grupos: SHAM – laminectomia, SCI – lesado. Total de animais analisados SHAM =5, SCI = 5 com lesão aguda e 5 com lesão crônica.

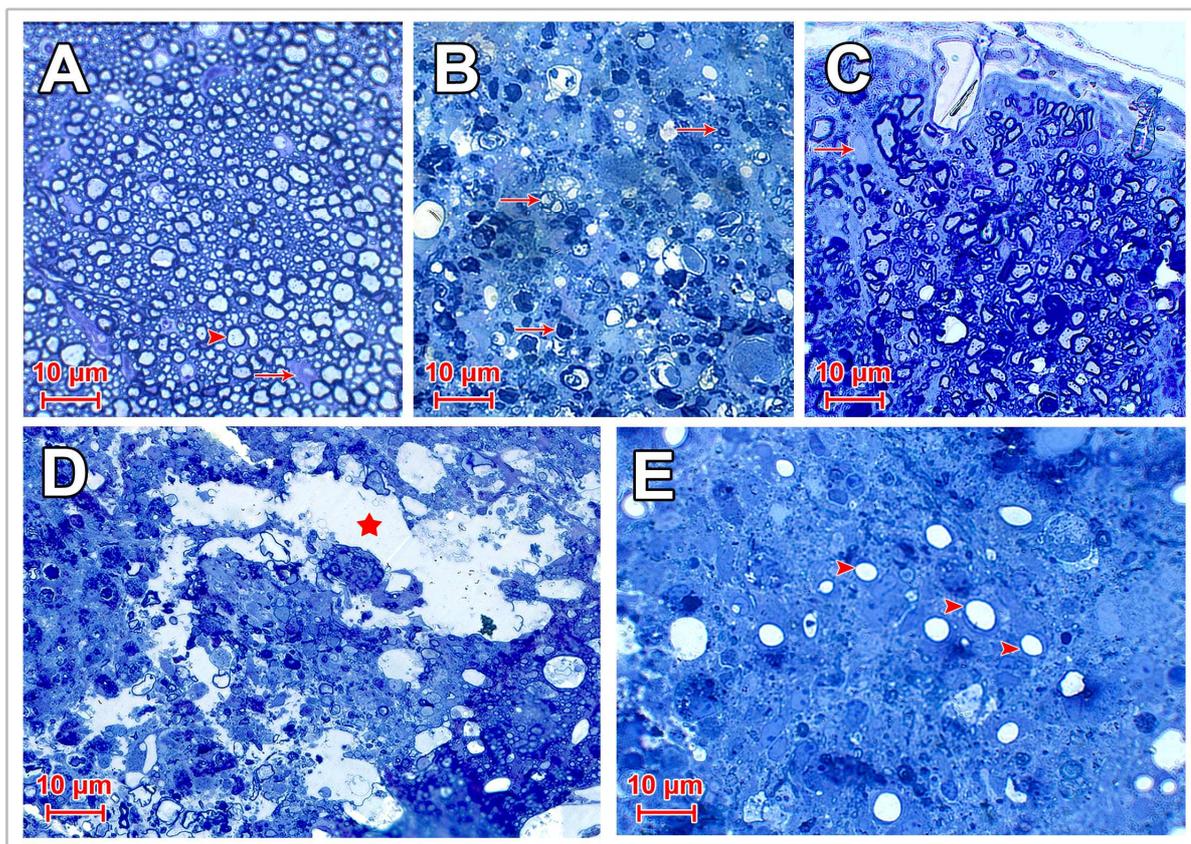


Figura 15: Cortes semifinos transversais corados com azul de Toluidina. (A) Grupo SHAM apresentou organização normal das fibras (cabeça de seta) em fascículos, com as células da glia ao seu redor (setas). No grupo SCI, 7 dias após a lesão (B, D), a degeneração axonal (setas), e as áreas de edema (estrela vermelha) foram bastante evidentes, porém era possível observar áreas com fibras nervosas de pequeno calibre preservadas. Com 56 dias após lesão, o grupo SCI (C, E) apresentava as fibras nervosas mais organizadas do que na fase aguda, porém com exuberante gliose (C, seta) e angiogênese evidente (E, cabeças de seta). Legendas dos grupos: SHAM – laminectomia, SCI – lesado. Total de animais analisados SHAM = 5, SCI = 5 com lesão aguda e 5 com lesão crônica.

nervosas preservadas também foram vistas ao longo do período experimental, em ambas as fases aguda e crônica (figura 15B e C, respectivamente). Nós observamos o espessamento das meninges (figura 15C), após a lesão. Este fato foi bastante evidente, principalmente na região dorsal. Em geral vasos sanguíneos de grande calibre foram encontrados na pia-mater após lesão (figura 15C), estes vasos eram funcionais. Com 7 dias após lesão, áreas de edema e de pequenas cavitações (figura 15D) foram evidentes nas substâncias cinzenta e branca. Após 56 dias, havia franca angiogênese (com aumento no número e no calibre dos vasos, figure 15E) na substância branca e cinzenta. Em nosso estudo, nenhum dos animais apresentou formação de única grande cavidade após a lesão, mas sim de múltiplas pequenas cavitações.

Na fase aguda, cortes ultrafinos nos permitiram observar astrócitos com função fagocítica, ajudando na remoção dos debris de mielina e restos axonais (figura 16A). Fibras preservadas foram observadas entre as fibras degeneradas (figura 16B). Em algumas áreas, nós observamos a presença de vasos sanguíneos rompidos (figura 16B), provavelmente com a liberação de sangue no espaço extracelular. Foi possível também detectar invasão de fibroblastos no epicentro da lesão, durante a fase aguda. Isto foi representado pela presença das fibras de colágeno formadas por estas células, preenchendo as cavidades (figura 16C). Com 56 dias após lesão, o estudo da ultraestrutura revelou prolongamentos de astrócitos ao redor das pequenas cavitações (figura 16D) previamente descritas. Neste tempo analisado foi possível ver desmielinização e remielinização. Nós observamos mielinização de axônios centrais por oligodendrócitos (figura 17A) e por células de Schwann (figura 17B), do sistema nervoso periférico que provavelmente tenham invadido o epicentro da lesão.

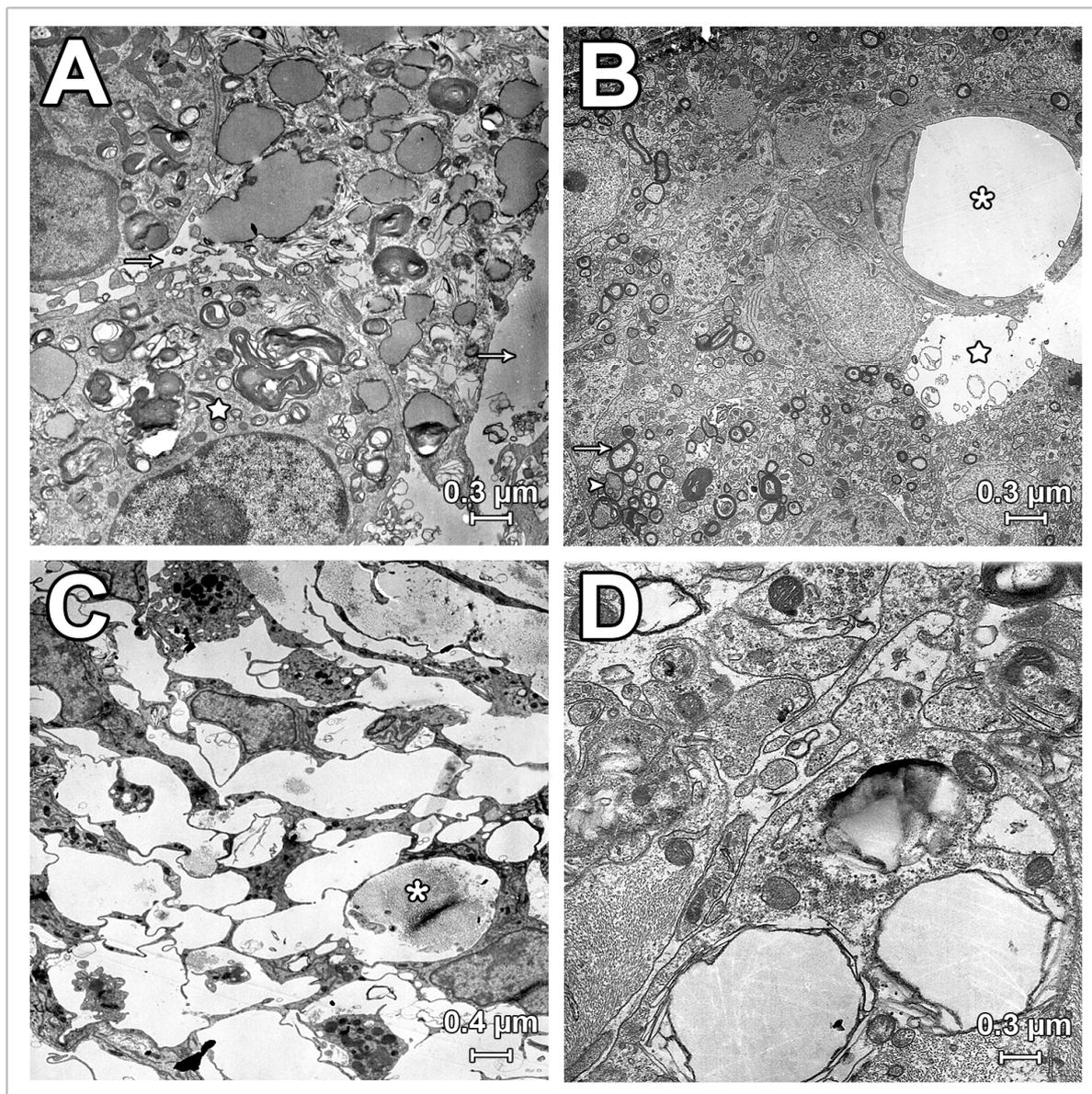


Figura 16: Análise ultraestrutural com 7 dias (A-C) e 56 dias após lesão (D). (A) Astrócito com evidente função fagocítica (estrela branca) e área de edema (seta) com aumento do espaço intercellular. (B) Fibras nervosas preservadas (seta) próximas a fibras em degeneração (cabeça de seta). Vaso de grande calibre, rompido (asterisco) com área de edema ao seu redor (estrela branca). (C) Invasão de fibroblastos no epicentro da lesão, mostrando cavidades preenchidas por colágeno (asterisco). (D) Microcavitação cercada por processo de astrócito. Legendas do grupo: SCI – lesado. Total de animais analisados SCI = 5 com lesão aguda e 5 com lesão crônica.

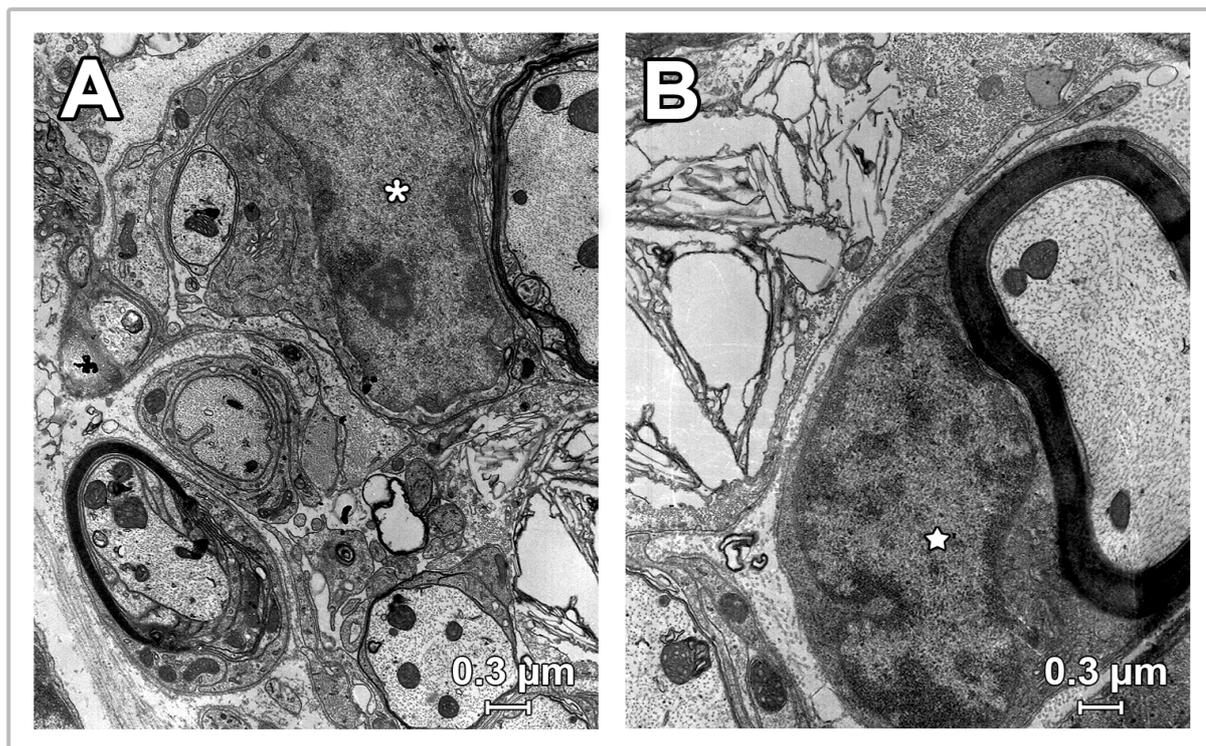


Figura 17: Microscopia eletrônica, com 56 dias após a lesão. Mielinização evidente no grupo SCI, na fase crônica da lesão, pelas duas células mielinizantes, oligodendrócito (A, asterisco) e por célula de Schwann (B, estrela branca). Estas fibras mielinizadas por Schwann estavam localizadas na periferia da substância branca, mais próximo à meninge. Legendas do grupo: SCI – lesado. Total de animais analisados SCI = 5 com lesão crônica.

4.3. Terapia celular: Análise Funcional

Para quantificar a recuperação funcional após lesão medular e terapia celular, os animais foram avaliados em um campo aberto, por 8 semanas após lesão, utilizando o teste de mobilidade global (Marques et al., in press, 2008) e a escala BMS (Basso et al., 2006). Qualitativamente, utilizamos o teste de impressão plantar para análise comparativa entre os grupos (Kunkel-Bagden et al., 1993).

4.3.1 Análise de Mobilidade global

A mobilidade do animal SHAM foi semelhante à mobilidade mostrada por todos os animais durante o pré-teste antes da lesão (Figura 18A). O grupo SHAM não mostrou nenhuma alteração no comportamento locomotor após laminectomia. Eles mantiveram um padrão exploratório constante, cruzando o campo aberto em toda sua extensão, e mantiveram a velocidade locomotora (15.80 ± 0.3887 cm/s) durante o período de avaliação. Todos os animais lesados apresentaram paralisia flácida 1 dia após a lesão, com grave comprometimento da sua locomoção. Inicialmente, estes animais mostraram movimentos ao redor do próprio eixo (figura 18B-D), independente de qual tratamento eles haviam recebido. Com 7 dias após lesão, os grupos SCI (figura 19B) e DMEM apresentaram o mesmo comportamento locomotor com restrição da tarefa exploratória persistente. Neste mesmo período, os animais do grupo MSCT (figura 19C) e EST (figura 19D) apresentaram uma melhor performance que o grupo DMEM. Após a primeira semana, os animais lesados começaram a atividade exploratória pelo campo aberto, usando principalmente as patas dianteiras para a locomoção. A velocidade locomotora aumentou

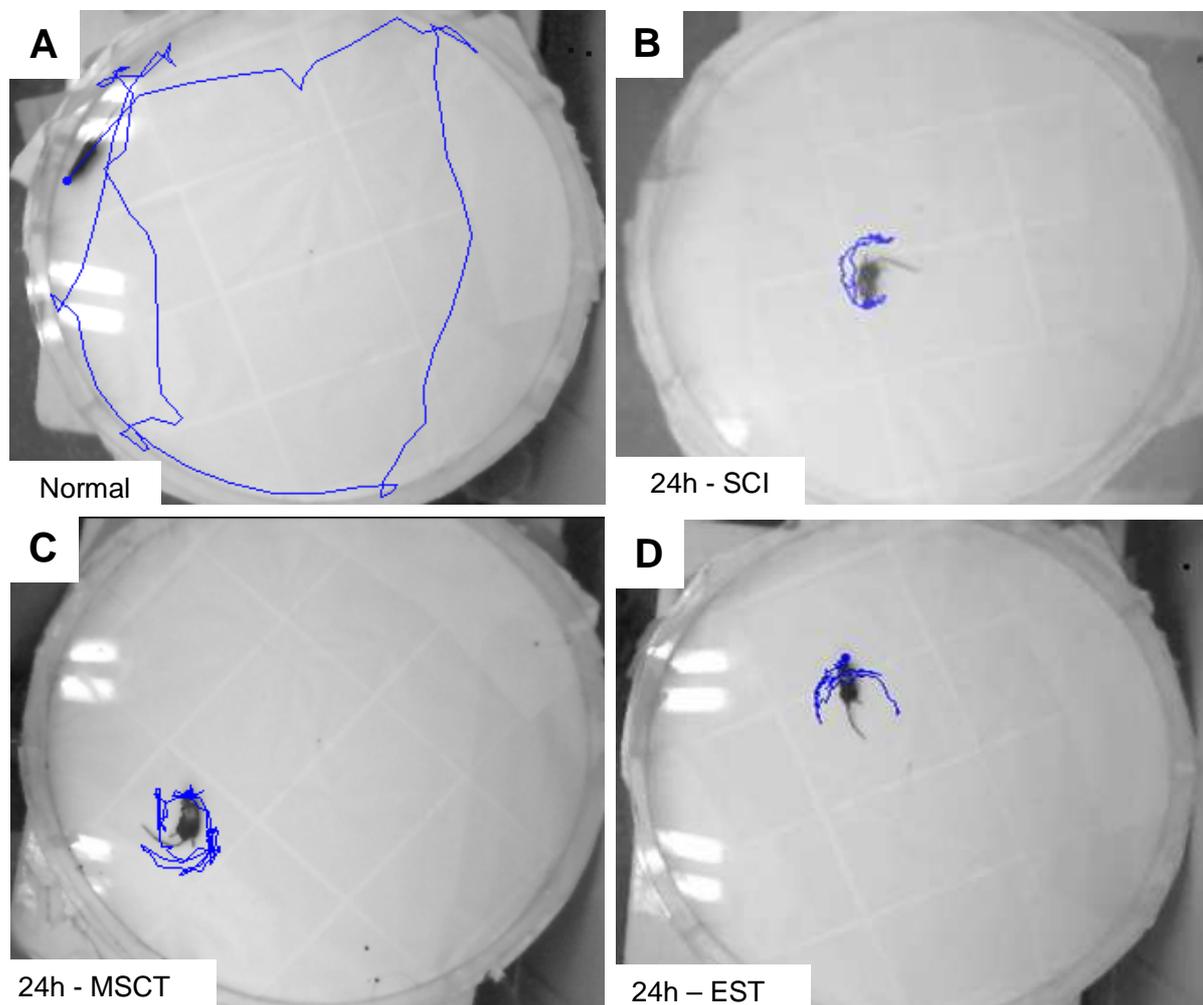


Figura 18: Teste de mobilidade global 24 horas após lesão. Análise quantitativa da progressão na velocidade e na distância percorrida após lesão medular. A linha azul demarca os trajetos percorridos pelos animais durante o mesmo espaço de tempo. (A) Animal sem lesão. (B) Animal do grupo lesado sem tratamento (SCI). (C) Animal do grupo lesado e tratado com células-tronco mesenquimais (MSCT). (D) Animal do grupo lesado e tratado com células-tronco embrionárias (EST). No 1º dia após lesão, todos os animais apresentaram paralisia das patas posteriores e seu comportamento motor foi restrito ao deslocamento lateral sobre seu próprio eixo, independente do grupo a que pertencesse, tratado ou não tratado. Total de animais analisados SHAM = 15, SCI = 12 com lesão aguda e 13 com lesão crônica, MSCT = 17 e EST = 18.

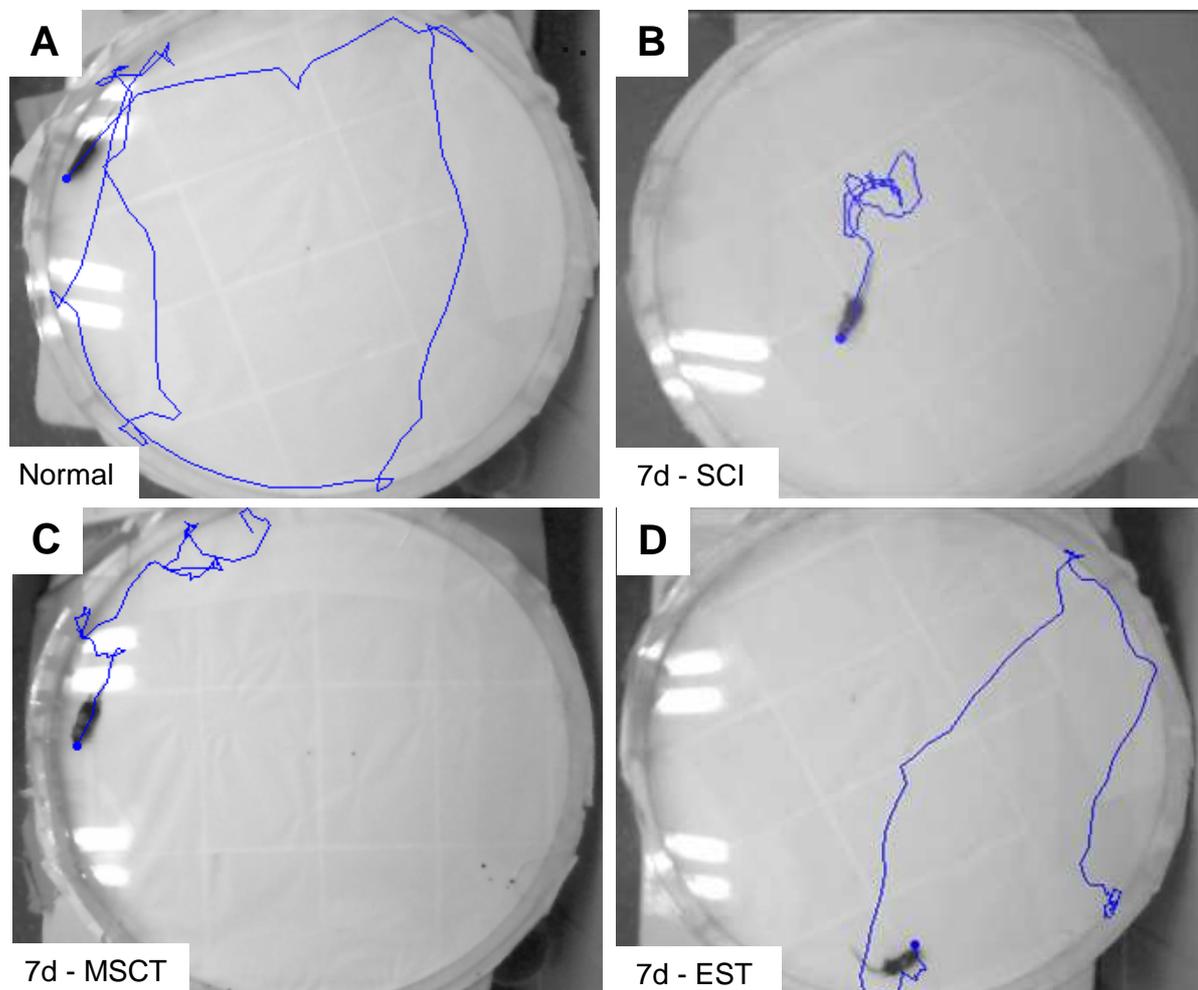


Figura 19: Teste de mobilidade global 7 dias após lesão. (A) Animal sem lesão. (B) Animal do grupo lesado sem tratamento (SCI). (C) Animal do grupo lesado e tratado com células-tronco mesenquimais (MSCT). (D) Animal do grupo lesado e tratado com células-tronco embrionárias (EST). Os animais dos grupos tratados apresentaram melhora significativa em sua velocidade de locomoção, a partir da primeira semana após lesão, e esta melhora progrediu gradativamente durante o período estudado, porém nenhum deles alcançou os parâmetros de normalidade. Neste período os animais dos grupos tratados apresentaram trajetória com maior exploração do campo aberto, e menos restrita ao espaço ao redor do próprio corpo; enquanto os animais do grupo SCI, mantinham esta movimentação sobre o próprio eixo ainda marcante. Total de animais analisados SHAM = 15, SCI = 12 com lesão aguda e 13 com lesão crônica, MSCT = 17 e EST = 18.

progressivamente em todos os grupos analisados (figuras 20 e 21, SCI, 5.581 ± 0.2905 cm/s; DMEM, 5.705 ± 0.2848 cm/s; MSCT, 9.313 ± 0.289 cm/s e EST, 10.73 ± 0.9076 cm/s) durante o período experimental, mas nenhum grupo alcançou o padrão de normalidade. A análise de mobilidade global mostrou diferenças significativas entre os grupos estudados (figura 22A). O grupo SHAM foi significativamente diferente, em relação aos outros grupos, em todos os tempos analisados ($p < 0.001$). O grupo MSCT diferiu significativamente do grupo SCI, a partir de 1º dia após a lesão, e do grupo DMEM, a partir de 21 dias após a lesão. O grupo EST apresentou diferença significativa em relação aos grupos SCI e DMEM a partir do 7º dia após a lesão ($p < 0.01$ até 14 dias, e $p < 0.001$ depois de 21 dias) e permaneceu até o último dia analisado. Os grupos lesados que receberam terapia celular apresentaram diferença estatisticamente significativa, entre eles, no último período analisado ($p < 0.01$); com o grupo EST apresentando um melhor desempenho locomotor. Os animais do grupo MSCT apresentaram uma melhora funcional significativa precoce, antes mesmo do grupo EST, porém alcançaram o platô de recuperação aproximadamente no período entre o 28º e 35º dia após a lesão. Estes animais tratados com células-tronco mesenquimais na fase aguda, apresentaram comportamento locomotor inconstante com aparente declínio da função após 6 semanas. Entre o 21º e o 56º dia após lesão, houve uma clara diferença na velocidade de locomoção e no comportamento exploratório entre os grupos SCI e EST (Figura 20 e 21). Os grupos SCI e DMEM apresentaram recuperação espontânea limitada, e alcançaram um platô máximo de recuperação entre a 3ª e a 4ª semana após a lesão, sem melhora significativa da mobilidade global depois disso. Ao longo das 8 semanas analisadas, estes grupos não mostraram qualquer diferença estatística significativa entre eles ($p > 0.05$). Ao término da 8ª semana, eles

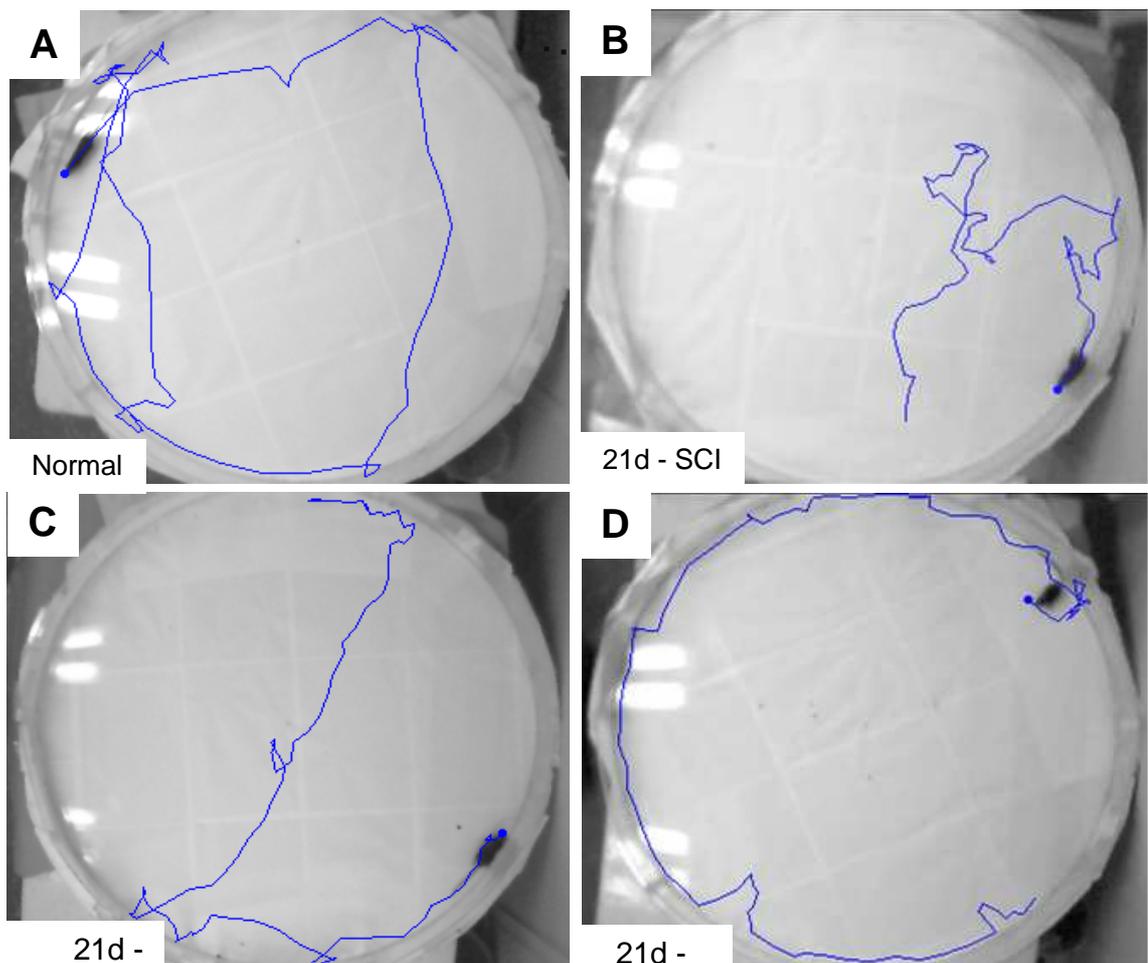


Figura 20: Teste de mobilidade global 21 dias após lesão. Análise da progressão na velocidade e distância percorrida após lesão medular. (A) Animal sem lesão (B) Animal do grupo lesado sem tratamento (SCI). (C) Animal do grupo lesado e tratado com células-tronco mesenquimais (MSCT). (D) Animal do grupo lesado e tratado com células-tronco embrionárias (EST). A partir deste período os animais do grupo SCI apresentaram aparente estagnação de sua melhora espontânea, e cursaram com poucos ganhos em sua mobilidade global. Os animais tratados prosseguiram sua recuperação locomotora. Total de animais analisados SHAM = 15, SCI = 13 com lesão crônica, MSCT = 17 e EST = 18.

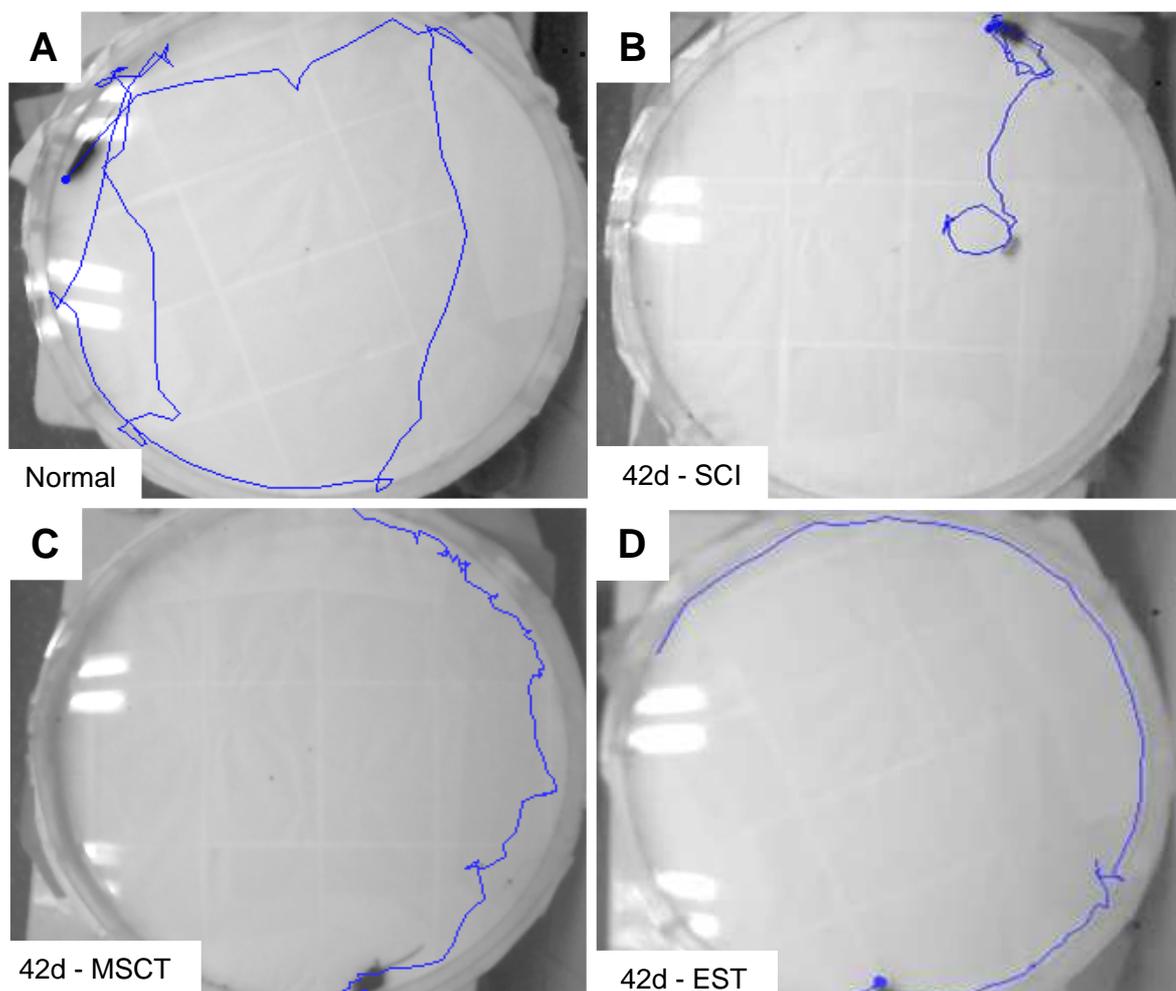


Figura 21: Teste de mobilidade global 42 dias após lesão. (A) Animal sem lesão (B) Animal do grupo lesado sem tratamento (SCI). (C) Animal do grupo lesado e tratado com células-tronco mesenquimais (MSCT). (D) Animal do grupo lesado e tratado com células-tronco embrionárias (EST), percorrendo o campo aberto. Com 42 dias após lesão, os animais tratados com células-tronco ainda apresentavam ganho funcional, apesar dos animais do grupo MSCT apresentarem uma tendência a estagnação em sua performance a partir de 28 dias após lesão. Os animais tratados apresentaram melhora significativa em sua velocidade de locomoção em relação ao grupo sem tratamento, porém nenhum deles alcançou os parâmetros de normalidade. Total de animais analisados SHAM = 15, SCI = 13 com lesão crônica, MSCT = 17 e EST = 18.

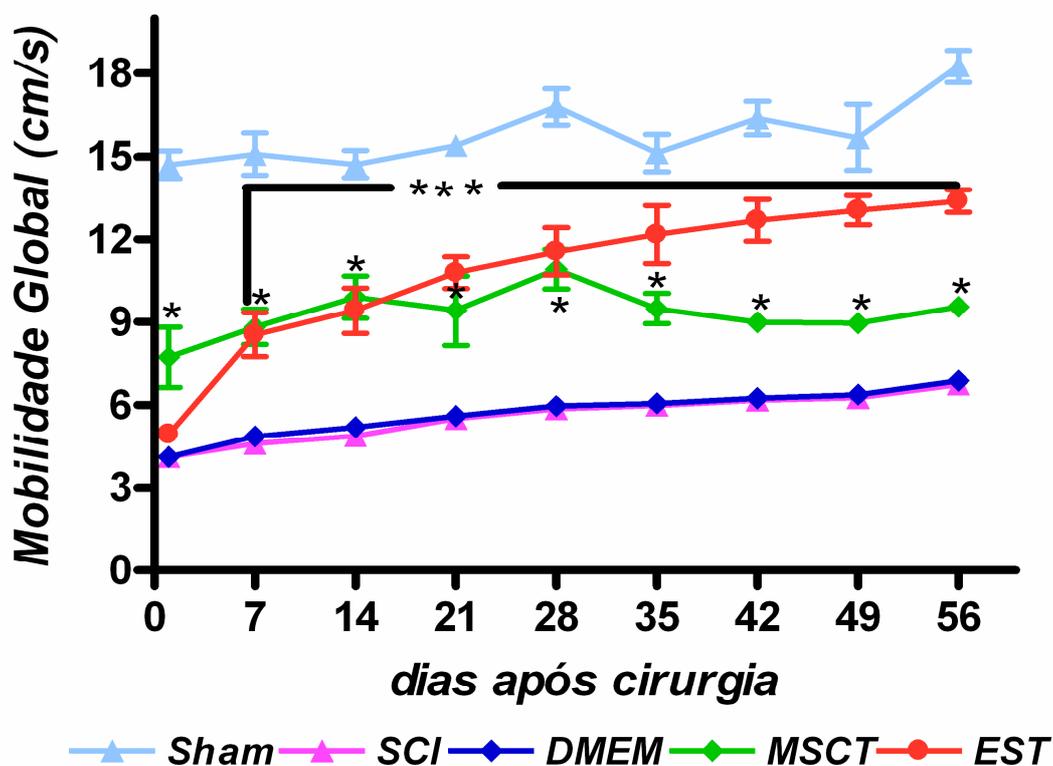


Figura 22: Análise comparativa da progressão da mobilidade global. Comparação entre os grupos no período de 56 dias após lesão. A velocidade locomotora aumentou progressivamente em todos os grupos analisados (SCI, 5.581 ± 0.2905 ; DMEM, 5.705 ± 0.2848 ; MSCT 9.313 ± 0.289 e EST, 10.73 ± 0.9076), mas nenhum grupo alcançou o padrão de normalidade. O grupo SHAM (15.80 ± 0.3887) foi significativamente diferente, em relação aos outros grupos, em todos os tempos analisados ($p < 0.001$). O grupo MSCT foi significativamente diferente do grupo SCI a partir do 1º dia após a lesão, e do grupo DMEM, a partir de 21 dias após a lesão. O grupo EST apresentou diferença significativa em relação aos grupos SCI e DMEM a partir do 7º dia após a lesão ($p < 0.01$ até 14 dias, e $p < 0.001$ depois de 21 dias) e permaneceu até o último dia analisado. Os grupos tratados com células-tronco apresentaram diferença estatisticamente significativa, entre eles, no último período analisado ($p < 0.01$), com o grupo EST apresentando melhor desempenho locomotor. Total de animais analisados SHAM = 15, SCI = 13 com lesão crônica, MSCT = 17 e EST = 18.

apresentavam atrofia muscular e deformidades estruturais, tais como, escolioses. Os resultados estatísticos comparativos entre os cinco grupos estudados, foram apresentados como média \pm SEM, e foram plotados como um gráfico de linha (Figura 22).

4.3.2 Teste do campo-aberto e BMS

Todos os camundongos usados neste estudo apresentaram uma avaliação com escore máximo pela BMS (escore 9) durante a avaliação no pré-teste. Os resultados estatísticos comparativos entre os cinco grupos estudados foram apresentados como média \pm SEM, e plotados em um gráfico de linha (figura 23). O grupo SHAM não mostrou nenhum déficit óbvio depois de recuperação da anestesia, exibiu locomoção normal e manteve o escore máximo pela BMS ao longo do período avaliado (8.981 ± 0.01852). Imediatamente após a cirurgia, todos os grupos lesados apresentaram paralisia flácida sem movimento de pata traseira, e geralmente apresentaram este padrão 1 dia após a cirurgia (BMS escore 0). Alguns animais dos grupos SCI, DMEM e MSCT melhoraram, pela BMS, até a fase intermediária de recuperação, sem melhora funcional adicional. Estes grupos, SCI (2.037 ± 0.3994), DMEM (2.111 ± 0.3889) e MSCT (2.685 ± 0.431) recuperaram movimento de tornozelo discreto entre a 1ª semana e a 2ª semana (BMS escore 1), e depois apresentaram melhora até realizar passos. Durante as primeiras 3 semanas, estes grupos recuperaram movimento amplo de tornozelo (BMS escore 2), e alguns animais alcançaram passos dorsais (BMS escore 3). Entre a 5ª e a 8ª semana depois da lesão, eles apresentaram passos dorsais freqüentes (BMS escore 3) ou passo plantar ocasional (BMS escore 4), mas sem qualquer coordenação. Dos 3 grupos, o

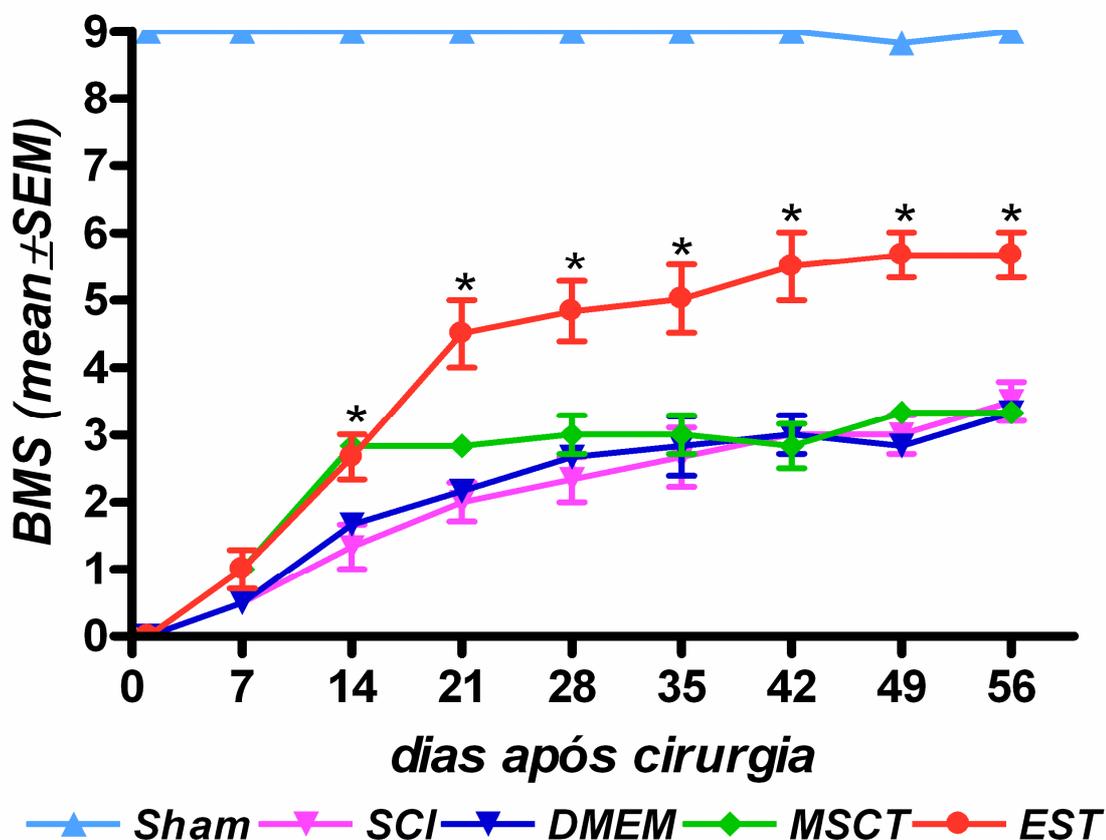


Figura 23: Análise comparativa do escore da avaliação locomotora BMS. Comparação entre os grupos no período de 56 dias após lesão. O grupo SHAM não mostrou nenhum déficit óbvio após a cirurgia (8.981 ± 0.01852) e foi diferente estatisticamente de todos os grupos ($p < 0.001$). Alguns animais dos grupos SCI (2.037 ± 0.3994), DMEM (2.111 ± 0.3889) e MSCT (2.685 ± 0.431) melhoraram até a fase intermediária de recuperação, sem apresentar diferença estatística entre eles ($p > 0.05$). Animais do grupo EST (3.872 ± 0.7112) foram significativamente diferentes dos outros grupos lesados ($p < 0.01$) a partir de 14 dias após lesão e alcançaram a fase final da recuperação. Total de animais analisados SHAM = 15, SCI = 13 com lesão crônica, MSCT = 17 e EST = 18.

grupo MSCT apresentou evolução discretamente mais rápida, atingindo escore 3 na 2ª semana, porém sua evolução no decorrer do período analisado não foi tão positiva. Este grupo apresentou, apenas no 14º dias após lesão, significância estatística em relação aos grupos SCI e DMEM. Animais do grupo EST (3.872 ± 0.7112) alcançaram movimento de tornozelo extenso aproximadamente 14 dias após a lesão, e apresentaram melhor evolução, alcançando a fase final da recuperação com passos plantares freqüentes, suporte de peso e alguma coordenação, entre a 4ª e a 5ª semana. Animais EST, também apresentaram menos atrofia e escolioses durante o período de estudo quando comparado com os outros grupos lesados. A análise estatística indicou diferenças significativas entre os grupos SHAM ($p < 0.001$) e EST ($p < 0.01$), em relação aos demais grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos SCI e DMEM ($p > 0.05$).

4.3.3 Teste da impressão plantar

Antes da lesão, todos os animais mostraram coordenação normal entre as patas dianteiras e traseiras. O grupo SHAM manteve a impressão dos passos com padrão de normalidade (figura 24A), mas nos grupos lesados houve acentuada alteração no padrão de marcação da impressão plantar, de acordo com o grupo avaliado. Nos grupos SCI e DMEM não foi possível detectar nenhuma impressão plantar em azul (SCI, figura 24B). Os grupos tratados com células-tronco apresentaram marcação evidente das patas posteriores. Os animais MSCT (figura 24C) apresentaram marcação da pata posterior, porém com uma impressão arrastada no papel, sem impressão plantar em vários ciclos de passo. Os animais EST (figura 24D) apresentaram marcação da pata posterior com passos plantares

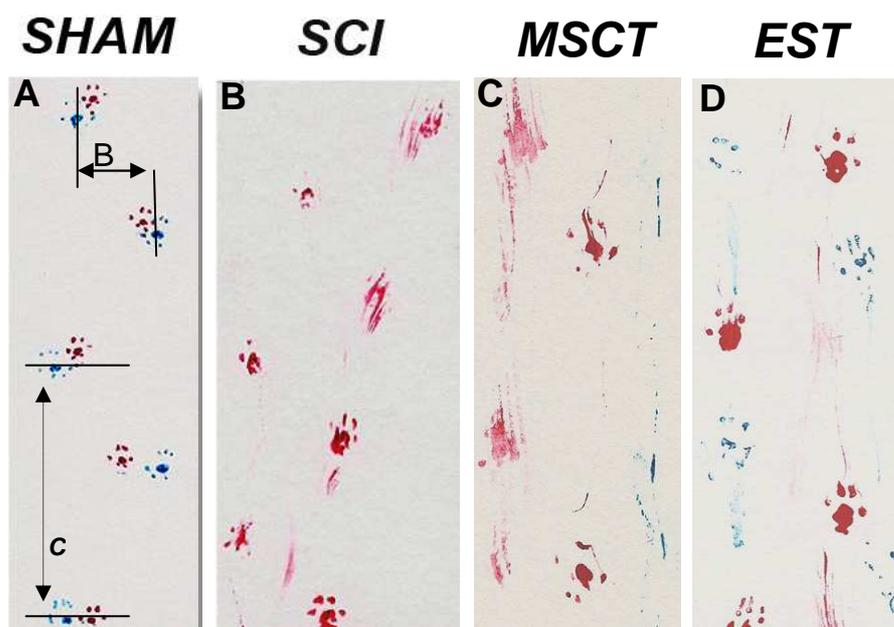


Figura 24: Teste da impressão plantar. Análise qualitativa da impressão plantar entre os grupos estudados. (A) O grupo SHAM não apresentou alteração dos passos após cirurgia. (B) Os grupos SCI e DMEM não apresentaram impressão plantar após lesão. (C) O grupo MSCT apresentou marcação da pata posterior (PT) porém sem impressão plantar perfeita. Podemos observar, neste grupo, a marcante assimetria (apenas PT direita marcada) e o arrastar das patas, tanto traseiras como dianteiras. A adaptação biomecânica e alteração no ritmo do passo são responsáveis por esta impressão arrastada dianteira. (D) Animais do grupo EST apresentaram impressão plantar adequada, porém mantendo algumas impressões arrastadas tanto em patas dianteiras quanto traseiras. Legenda dos grupos: Sham – grupo laminectomizado, SCI - grupo lesado sem tratamento, MSCT - grupo lesado e tratado com células mesenquimais e EST - grupo lesado e tratado com células tronco embrionárias. Total de animais analisados SHAM = 15, SCI = 13 com lesão crônica, MSCT = 17 e EST = 18.

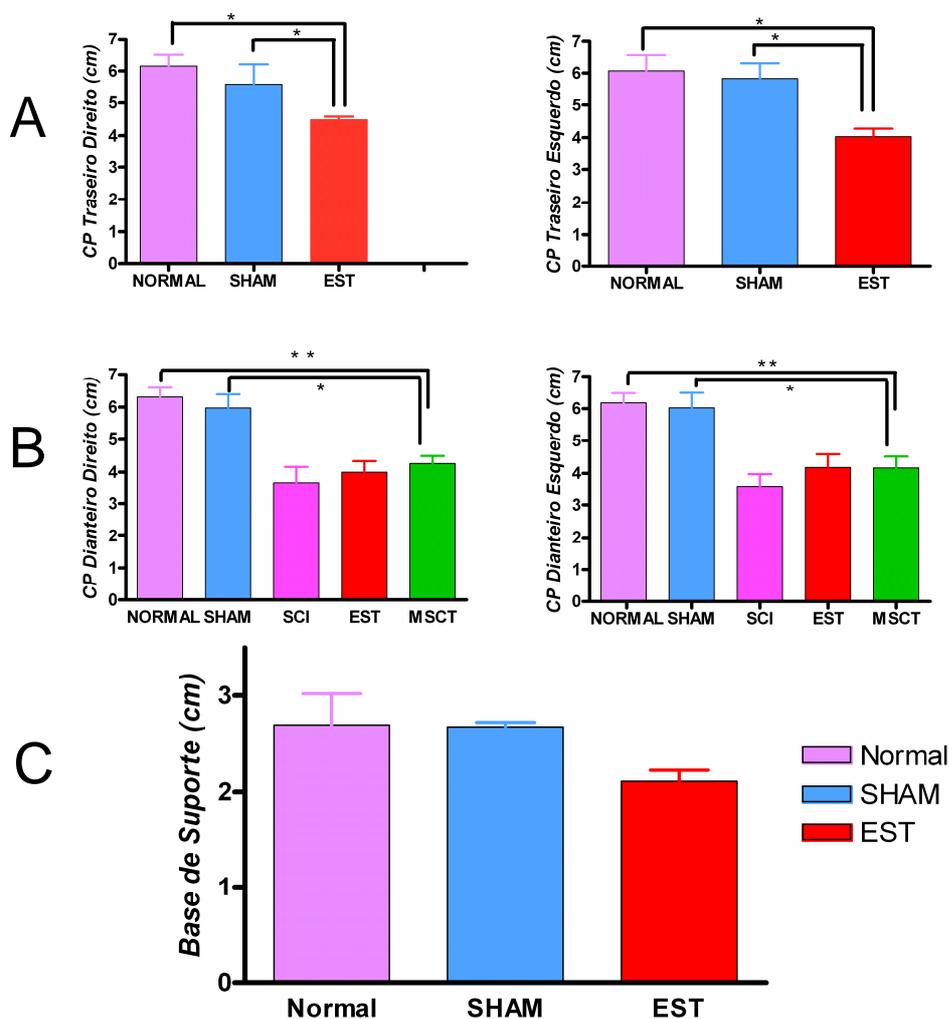


Figura 25: Análise estatística da impressão plantar. Apenas o grupo EST permitiu obtenção de dados das patas traseiras para a quantificação. O comprimento dos passos (CP) diminuiu significativamente, após 8 semanas de lesão. Esta diferença estatística foi evidente para as patas traseiras (A), com déficit sensorio motor, e também para as patas dianteiras (B), que não apresentavam qualquer déficit decorrente da lesão medular. Apesar da base de suporte (BS) estar diminuída nos animais EST, não houve diferença estatisticamente significativa, indicando que a principal compensação biomecânica provavelmente não é realizada a partir da correção da base de suporte, como nos bípedes. **= $p < 0.01$ * = $p < 0.05$. Legenda dos grupos: Normal – sem intervenção, Sham – grupo laminectomizado e EST - grupo lesado e tratado com células tronco embrionárias. Total de animais analisados Normal = 10, SHAM = 15 e EST = 18.

evidentes. O grupo EST foi o único que apresentou impressões plantares adequadas à obtenção dos dados das patas posteriores para a quantificação dos seguintes itens: comprimento dos passos (CP) direito e esquerdo e base de suporte (BS, distância entre as PT). O comprimento dos passos posteriores bilaterais diminuiu significativamente (figura 25A), após 8 semanas de lesão. Esta diferença estatística foi evidente também para as patas dianteiras (figura 25B), as quais não apresentam déficit sensório-motor. Apesar da base de suporte estar diminuída nos animais EST, não houve diferença estatisticamente significativa (figura 25C). Nossos resultados apontam para melhora locomotora, com o aumento no número de passos plantares, nos animais submetidos à terapia celular. Não houve diferença estatística entre os animais dos grupos SHAM e normal. A análise quantitativa do CP ($p < 0.05$) apresentou diferença estatística entre os animais normais e SHAM em relação aos animais EST, porém não houve alteração estatisticamente significativa em relação ao item BS ($p > 0.05$).

4.4 Terapia celular: Análise Morfológica

4.4.1 Microscopia de luz

Figura 26A mostra esquema da compressão extradural da medula espinal no modelo utilizado por nós neste trabalho. Cortes transversais de medula espinal do grupo EST, com 56 dias após lesão, permitiram detectar células Cell Tracer® positivas no epicentro da lesão e em áreas circunvizinhas (rostral e caudal à lesão) (figura 26B); estas áreas, fluorescentes em vermelho, eram DAPI positivas (figura 26C), confirmando que são núcleos de células. Esta marcação em vermelho não foi

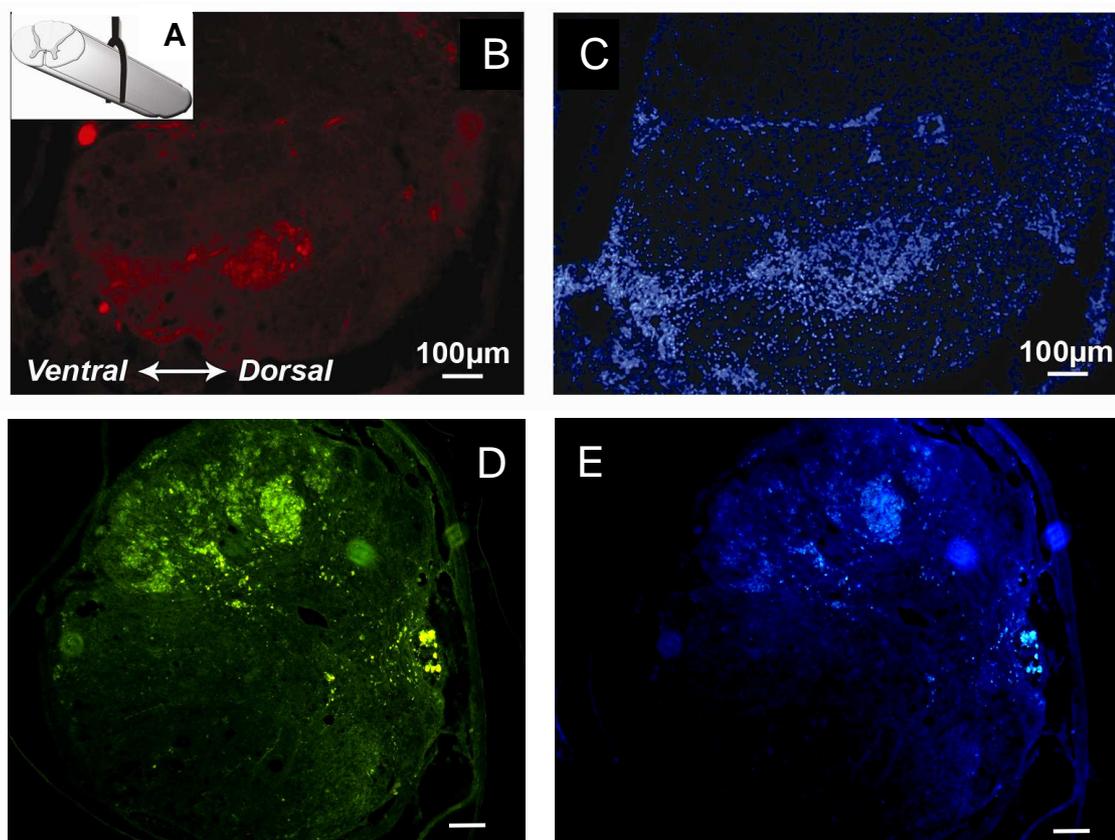


Figura 26: Microscopia de luz, células-tronco no sítio da lesão. (A) Esquema do clipe comprimindo a medula espinal ao nível de T9 para promover a lesão. Cortes transversais de medula espinal do grupo EST (B,C) e MSCT (D,E), com 56 dias após lesão. (B) Medula espinal de animais do grupo EST com células Cell Tracer® positivas no epicentro da lesão; fluorescentes em vermelho, as mesmas áreas são DAPI positivas (C) indicando que são núcleos celulares. (D) Medula espinal de animais do grupo MSCT com células mesenquimais GFP+, no epicentro da lesão, fluorescentes em verde, estas áreas são DAPI positivas (E). Estes dados sugerem que estas células-tronco estão presentes no tecido hospedeiro, provavelmente viáveis após 8 semanas de injeção. Barra: 100µm. Legenda dos grupos: EST - grupo lesado e tratado com células tronco embrionárias e MSCT - grupo lesado e tratado com células tronco mesenquimais.

evidente em qualquer outro grupo analisado. Cortes transversais de medula espinal do grupo MSCT, com 56 dias após lesão, permitiram detectar células mesenquimais GFP⁺, no epicentro da lesão e em áreas circunvizinhas (rostral e caudal à lesão) (Figura 26D); estas áreas, fluorescentes em verde, também eram DAPI positivas (figura 26E). Estes dados indicam que estas áreas marcadas correspondem às células transplantadas por nós imediatamente após a lesão. Isto sugere que estas células-tronco estão presentes no tecido 8 semanas após a injeção, provavelmente viáveis, e que apresentaram migração para regiões distantes do epicentro da lesão, em direção rostral e caudal, provavelmente interagindo com o tecido hospedeiro.

4.4.2 Quantidade de substância branca preservada

Figura 27A apresenta uma visão esquemática de um corte transversal de medula espinal corado com LFB, na qual a área azul mais escura entre as linhas pontilhadas representa a área de substância branca quantificada. A diminuição das áreas coradas com LFB foi observada em todos os grupos lesados. Os grupos que receberam terapia celular apresentaram preservação significativa da substância branca. Porém, o grupo EST mostrou uma melhor preservação e distribuição desta substância. A quantificação da substância branca preservada (Figura 27B) indicou maior preservação no grupo EST (46.80 ± 1.242 , média \pm SEM) quando comparado aos grupos MSCT (39.97 ± 0.9252 , $p < 0.001$) e SCI (35.69 ± 1.435 , $p < 0.001$). Apesar da diferença em relação ao grupo EST, o grupo MSCT também foi estatisticamente significativo em relação ao grupo SCI ($p < 0.05$), indicando uma maior preservação da substância branca. O grupo SHAM (52.73 ± 0.5116) mostrou um padrão normal de distribuição da substância branca e foi estatisticamente significativo em relação a

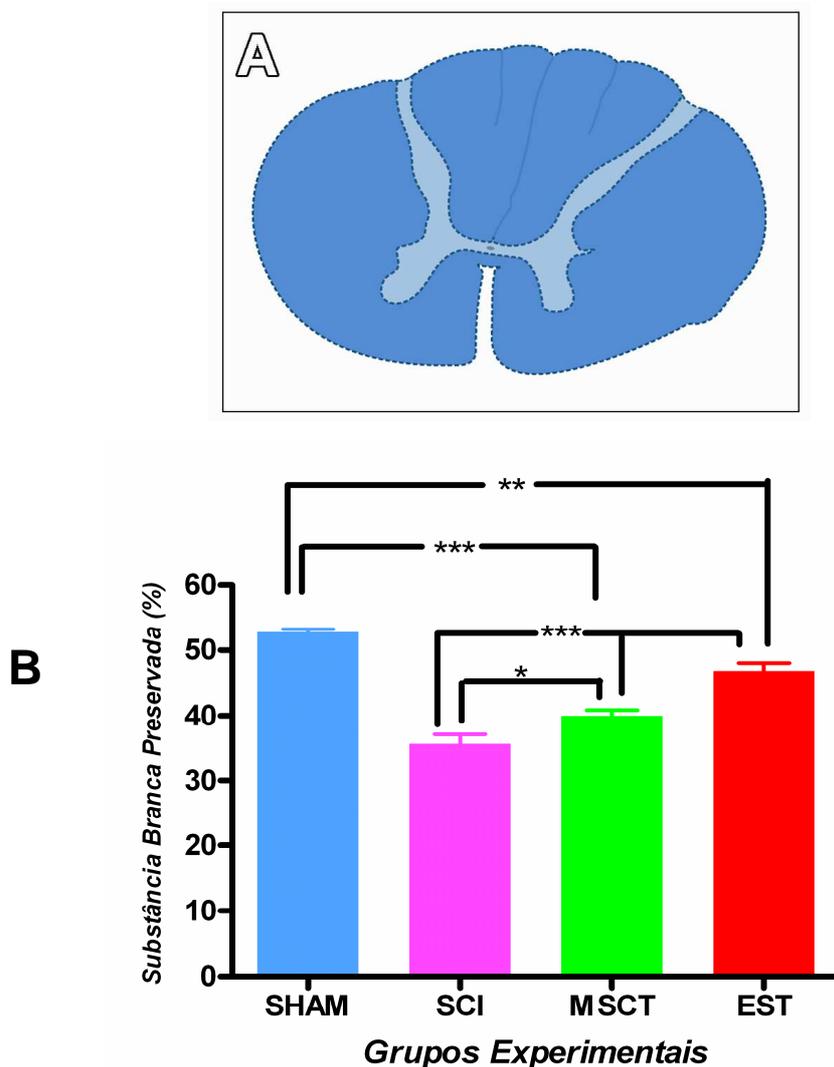


Figura 27: Avaliação quantitativa da substância branca preservada. (A) Visão esquemática de um corte transversal da medula espinal, corada com LFB, na qual a área azul mais escura entre as linhas pontilhadas representa a área de substância branca quantificada. (B) Gráfico de barra exibindo os resultados da morfometria da substância branca. O animal SHAM não apresentou alteração em relação ao animal normal e foi significativamente diferente dos outros grupos analisados ($p < 0.001$ para os grupos SCI e MSCT, e $p < 0.01$ para o grupo EST). O grupo EST apresentou maior preservação da substância branca quando comparado com os demais grupos lesados ($p < 0.001$). O grupo MSCT também apresentou preservação significativa em relação ao grupo SCI ($p < 0.05$). * * * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, e * $p < 0.05$. Legenda dos grupos: SHAM – grupo laminectomizado, SCI – lesado sem tratamento, MSCT – lesado e tratado com células-tronco mesenquimais e EST - grupo lesado e tratado com células tronco embrionárias. Total de animais analisados SHAM = 5, SCI = 5, MSCT = 5 e EST = 5.

todos os outros grupos ($p < 0.001$ em relação aos grupos MSCT e SCI, e $p < 0.01$ em relação ao grupo EST).

4.4.3 Fibras mielínicas normais preservadas

Figura 28A-D mostra cortes transversais semifinos da região de funículo anterior de animais dos grupos SHAM (A), SCI (B), EST (C) e MSCT (D). Na quantificação do número de fibras mielínicas preservadas, o grupo SHAM ($1,295 \pm 79.31$, média \pm SEM) mostrou-se semelhante ao animal normal, e diferiu significativamente dos outros grupos ($p < 0.001$). Perda quase total de fibras mielínicas foi observada em todos os animais não tratados com terapia celular, e isto foi acompanhado por intensa gliose e desorganização estrutural. Embora seja possível observar fibras preservadas no grupo SCI, em geral estas fibras apresentavam pequeno calibre. Os grupos de terapia celular apresentaram melhor organização estrutural, e apresentavam fibras preservadas com diferentes calibres (pequeno, médio e grande). Os animais dos grupos EST (279.4 ± 16.33 , $p < 0.01$) e MSCT (241.2 ± 22.32 , $p < 0.05$) apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo SCI (81.39 ± 8.078), porém, não houve diferença significativa entre eles ($p > 0.05$).

4.4.4 Microscopia eletrônica

A análise ultraestrutural das células-tronco embrionárias pré-diferenciadas com ácido retinóico, em cultura, evidenciou diferentes perfis celulares (figura 29). Algumas células apresentaram citoplasma elétron-denso (figura 29A), enquanto

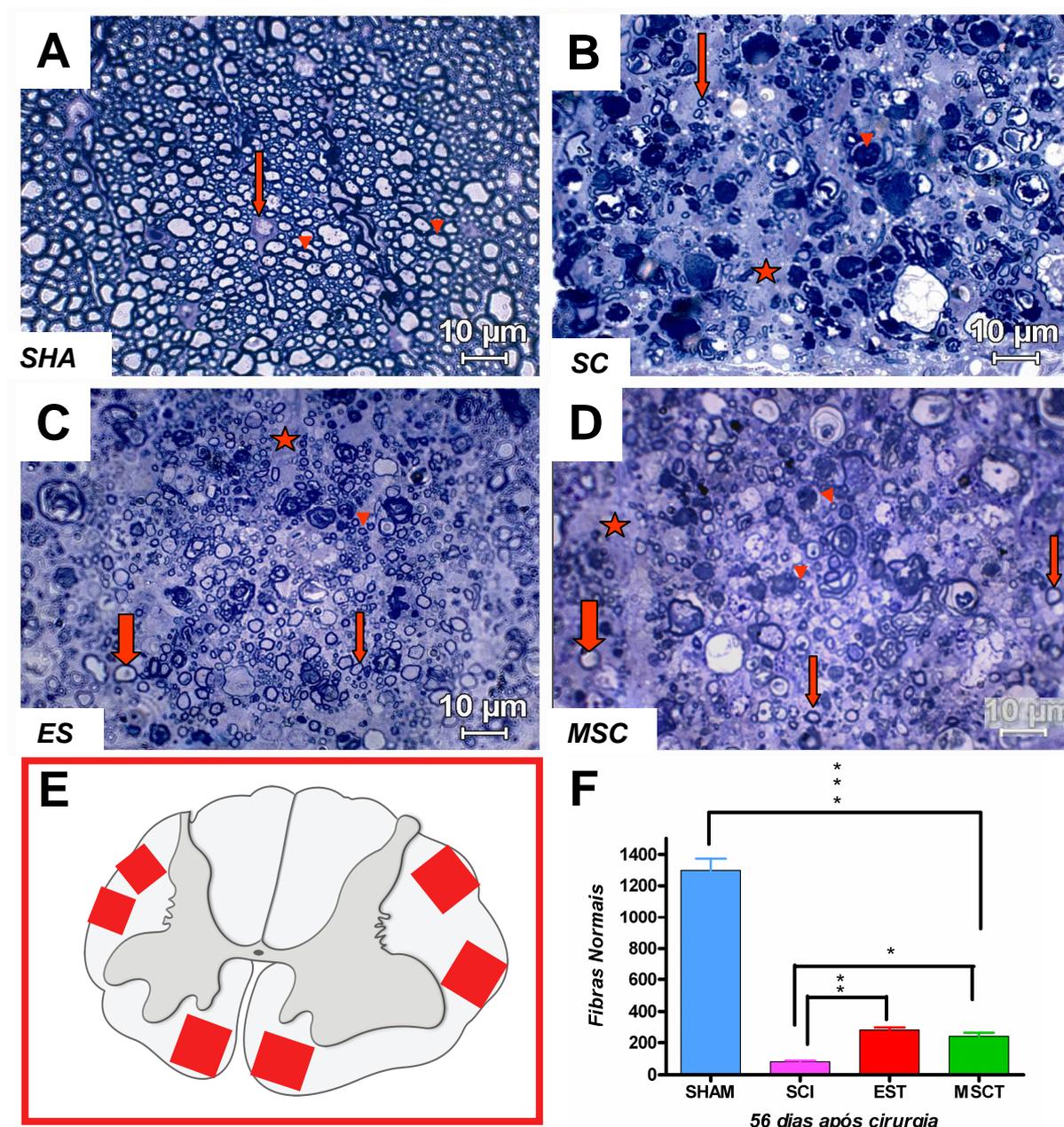


Figura 28: Quantificação das fibras nervosas preservadas. (A-D) Cortes semifinos transversais do funículo anterior da medula espinal. (A) SHAM apresentou organização normal, com axônios mielinizados (cabeças de seta) e células gliais (seta) ao seu redor. (B) Desorganização estrutural evidente no grupo SCI, com fibras degeneradas, astrogliose reativa (estrela), debris de mielina (cabeça de seta) e axônios preservados de pequeno calibre. Os grupos tratados com células-tronco (EST-C e MSCT-D) apresentaram melhor organização e preservação das fibras nervosas de diferentes calibres (pequeno -cabeça de seta, médio - seta fina e grande -seta larga). Estrela vermelha – prolongamento de astrócito. (E) Esquema dos campo (em vermelho) utilizados para a quantificação das fibras preservadas em aumento de 1000x (F) Gráfico de barra exibindo os resultados da morfometria. O grupo SCI mostrou significativamente menos fibras normais que os grupos tratados e o grupo SHAM. * * * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$. Legenda dos grupos: SHAM – grupo laminectomizado, SCI – lesado sem tratamento, EST - grupo lesado e tratado com células tronco embrionárias e MSCT – lesado e tratado com células-tronco mesenquimais. Total de animais analisados SHAM = 5, SCI = 5, MSCT = 5 e EST = 5.

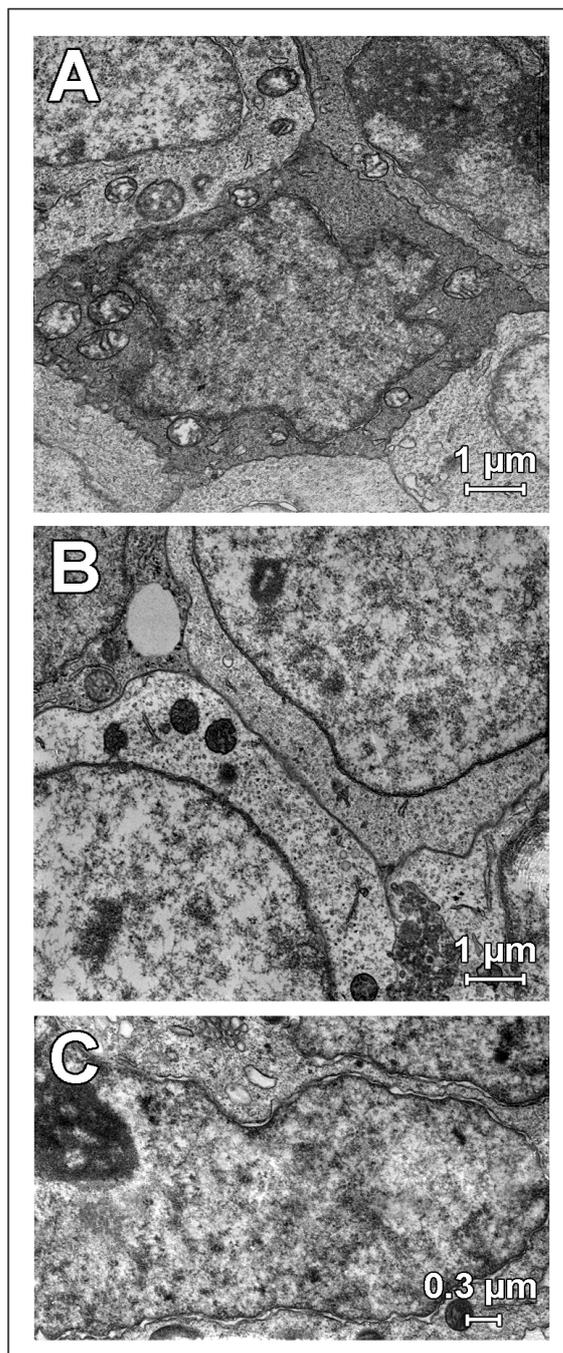


Figure 29: Microscopia eletrônica das células em cultura. (A-C) Análise ultraestrutural das células-tronco embrionárias pré-diferenciadas com ácido retinóico, mostrou diferentes perfis celulares em cultura; algumas células continham citoplasma elétron-denso (A, asterisco), enquanto outras continham citoplasma claro (B, estrela). Algumas destas células elétron-densas apresentavam um nucléolo evidente (C, seta).

outras apresentaram citoplasma elétron-lucente (figura 29B). Algumas destas células elétron-lucentes exibiram microtúbulos em seu citoplasma. Nós também observamos células escuras, com citoplasma abundante, exuberante em cisternas de Golgi e retículo endoplasmático, além disto elas apresentavam nucléolo evidente (figura 29C).

A figura 30 é representativa dos achados ultraestruturais observados em cortes transversais da medula espinal, 56 dias após lesão, de animais dos grupos SCI, EST e MSCT. O grupo SCI apresentou profunda desorganização estrutural, com perda das fibras nervosas e um aspecto de esvaziamento do tecido (figura 30A,B); enquanto nos grupos tratados com terapia celular, a perda de fibras era menos intensa e o tecido estava mais preservado (figura 30C-F). No grupo EST, foi possível evidenciar neurônios normais (figura 30C), estabelecendo contato sinápticos (dados não mostrados) e também células com citoplasma abundante, muito elétron-denso, preenchido por vários tipos de organelas, mantendo contatos sinápticos adequados com perfis adjacentes (figura 31). No grupo MSCT a preservação de fibras nervosas mielinizadas e de várias fibras em remielinização por oligodendrócitos, foi marcante com fibras exibindo axoplasma íntegro e menor calibre da bainha de mielina (figura 30E,F). Nós observamos remielinização, tanto por oligodendrócitos quanto por células de Schwann na periferia da substância branca, nos animais do grupo SCI (figura 32A e insert). Porém, esta remielinização foi mais abundante nos grupos tratados com células-tronco. No grupo EST, nós observamos várias células, que pareciam oligodendrócitos jovens, apresentando citoplasma claro e microtúbulos no seu interior. Estas células mielinizavam com o fenótipo de oligodendrócitos (figura 32), e eram bastante semelhantes às células elétron-lucentes que nós achamos nas células em cultura. Observamos também

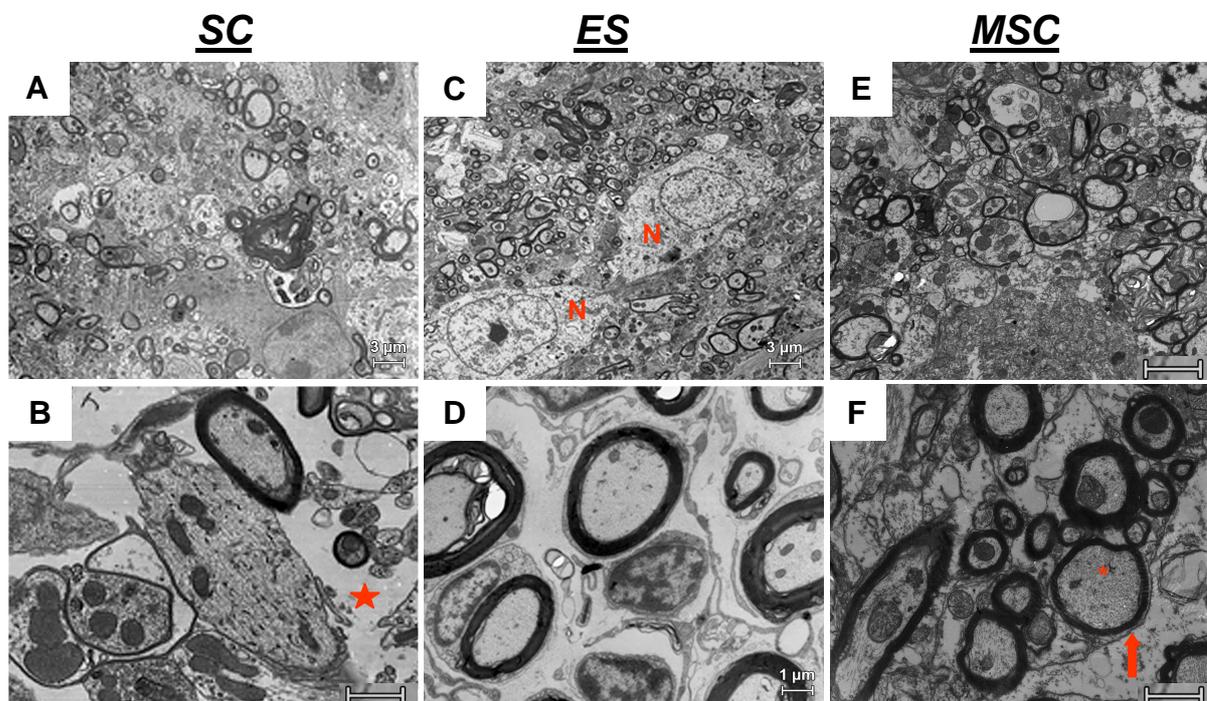


Figura 30: Cortes transversais ultrafinos de medula espinal, 56 dias após lesão. Análise comparativa entre o grupo SCI e os grupos tratados com células (EST e MSCT). No grupo SCI (A,B) houve grande desorganização estrutural, com a presença de espaços vazios (B, estrela), e uma perda evidente de fibras nervosas. O grupo EST (C, D) e o grupo MSCT (E, F) apresentaram uma melhor preservação estrutural, e foi possível achar neurônios com aspecto normal no grupo EST. Destacamos nestes grupos tratados a preservação das fibras nervosas mielinizadas. Em maior aumento (B,D e F) é possível observar o aumento do espaço intersticial em todos os grupos.(F) Observe uma fibra (asterisco) sendo remielinizada por prolongamento de oligodendrócito (seta) Barra: A,C e E = 3 μ m, B,D e F = 1 μ m. Legenda dos grupos: SCI – lesado sem tratamento, EST - grupo lesado e tratado com células-tronco embrionárias e MSCT – lesado e tratado com células-tronco mesenquimais. Total de animais analisados SCI = 5, MSCT = 5 e EST = 5.

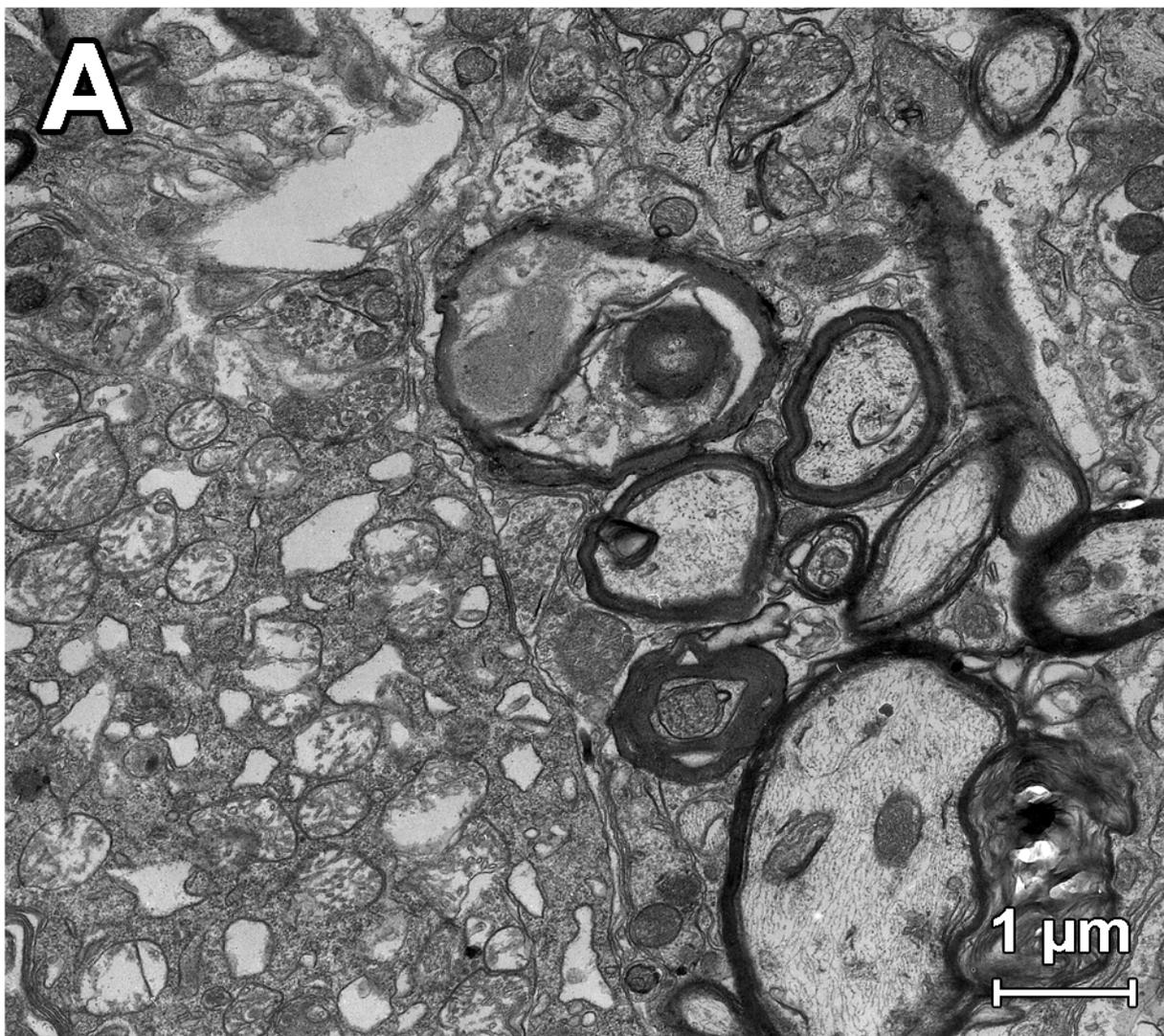


Figura 31: Cortes semifinos de medula espinal do grupo EST com 56 dias após lesão. É possível ver uma célula com citoplasma escuro (asterisco) contendo muitas organelas em seu citoplasma, as quais fazem contato sináptico (setas) com um perfil adjacente (estrela). Barra = 1 μm .

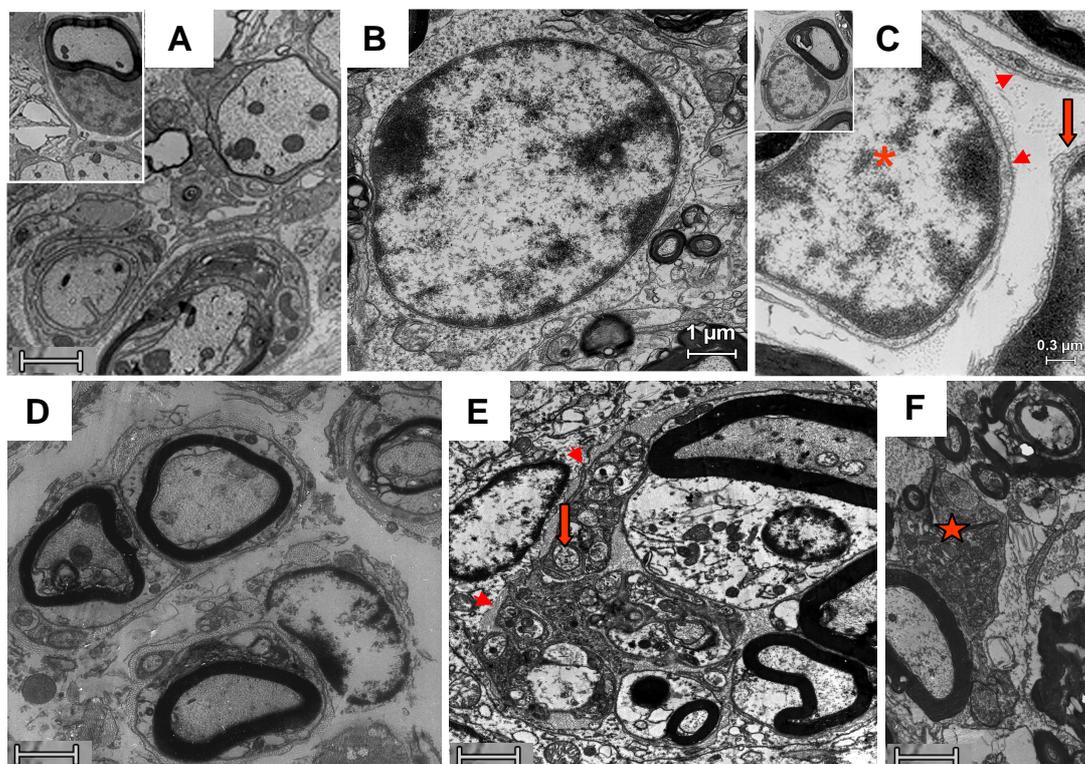


Figura 32: Remyelinização. Cortes transversas ultrafinos, com 56 dias após lesão. Podemos observar remielinização típica por oligodendrócito e por células de Schwann no grupo SCI (A). No grupo EST (B,C) observamos abundante remielinização por células com núcleo redondo e citoplasma electrónico-lucente (B) contendo microtúbulos, semelhantes a oligodendrócitos jovens. Também observamos, farta remielinização por célula de Schwann (C, asterisco), com sua lâmina basal típica (cabeças de seta) e por células com fenótipo de Schwann, com núcleo arredondado e citoplasma claro (inserte), as quais não formavam lâmina basal típica (seta). O grupo MSCT (D-F) também apresentou remielinização por células de Schwann típica (D), formando "ilhas regenerativas" como no SNP (E), e por oligodendrócito (estrela) Barra = A, C = 3 μm , B,E-F = 1 μm . Legenda dos grupos: SCI – lesado sem tratamento, EST - grupo lesado e tratado com células-tronco embrionárias e MSCT – lesado e tratado com células-tronco mesenquimais. Total de animais analisados SCI = 5, MSCT = 5 e EST = 5.

células com núcleos grandes remielinizando com fenótipo de células de Schwann (figura 32), como no SNP, mesmo mais distante da periferia do tecido, porém estas células não continham citoplasma elétron-denso ou formação de lamina basal, como uma típica célula de Schwann (figura 32F,G e insert). No grupo MSCT, observamos a remielinização por células de Schwann típica (figura 32D), inclusive formando ilhotas regenerativas (figura 32E), como no SNP, e remielinização franca por oligodendrócitos (figura 30E,F e 32F).

4.5 Terapia celular: Janela temporal para terapia

Realizamos um grupo tratado, com os dois tipos celulares estudados, na fase subaguda da lesão (injeção 7 dias após a lesão), a fim de realizar uma análise comparativa, com os animais tratados na fase aguda, em relação ao momento ideal para o transplante das células. Avaliamos funcionalmente os animais tratados na fase aguda (10 minutos após a lesão) e os animais tratados na fase subaguda. A performance funcional dos animais tratados em fase aguda, observada pelo teste de mobilidade global (figura 33A, MSCT 9.313 ± 0.289 e EST 10.73 ± 0.9076) foi superior a daqueles tratados durante a fase subaguda (MSCT 8.023 ± 0.4031 e EST 8.840 ± 0.6287), indicando uma tendência a melhor resposta motora quanto mais precoce for o tratamento. Nossos resultados utilizando a escala BMS (figura 33B) também apontam para uma melhor performance em um tratamento mais precoce (MSCT 2.685 ± 0.4316 e EST 3.872 ± 0.7112 , em fase aguda, e MSCT 1.981 ± 0.6694 e EST 3.704 ± 0.3209 , na fase subaguda). Este resultado foi encontrado para ambas as células-tronco testadas, porém a diferença entre os grupos tratados não foi estatisticamente significativa em nenhum dos testes ($p > 0.05$).

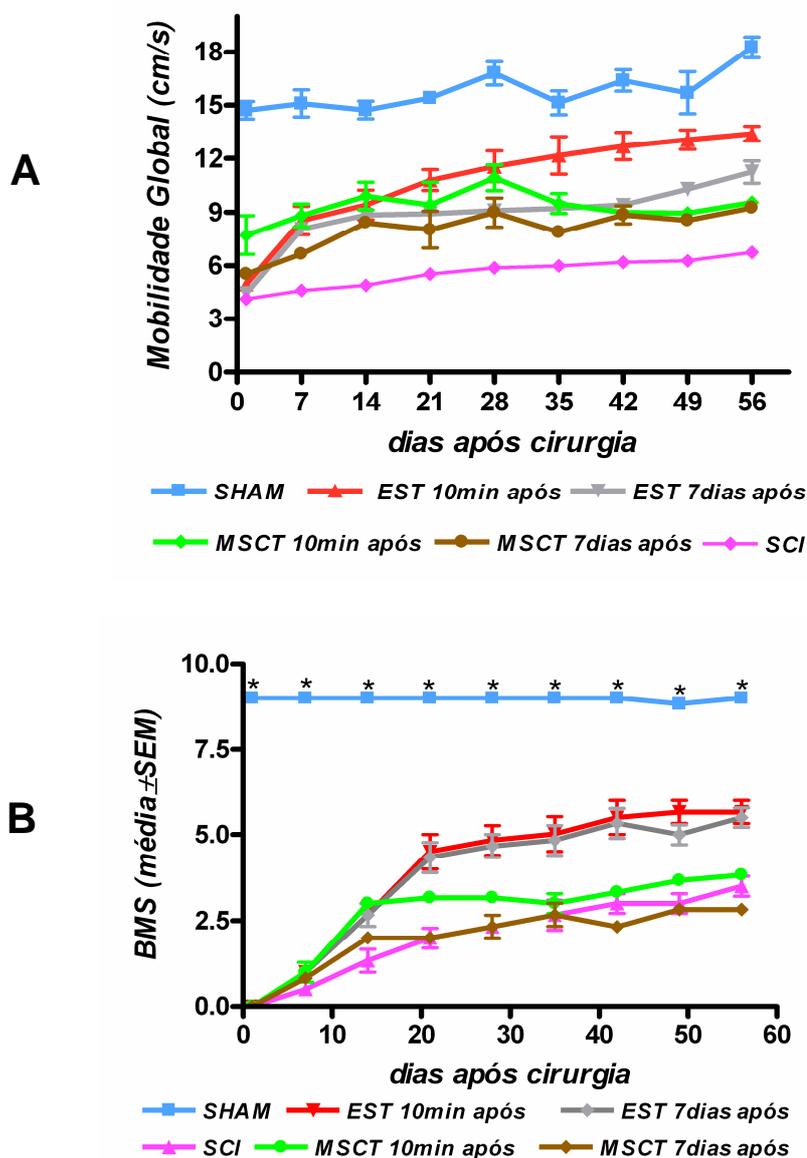


Figura 33: Análise da janela temporal para terapia celular. Comparação entre os grupos que receberam tratamento celular na fase aguda (10 minutos após lesão) ou subaguda (7 dias após lesão). (A) Gráfico de linha mostrando os resultados do teste de mobilidade global nos grupos com tratamento na fase aguda (MSCT 9.313 ± 0.289 e EST 10.73 ± 0.9076) e subaguda (MSCT 8.023 ± 0.4031 e EST 8.840 ± 0.6287). (B) Gráfico de linha com os resultados pela escala BMS nos grupos com tratamento na fase aguda (MSCT 2.685 ± 0.4316 e EST 3.872 ± 0.7112) e fase subaguda (MSCT 1.981 ± 0.6694 e EST 3.704 ± 0.3209). Embora os resultados apontem para uma melhor performance no animal tratado na fase aguda, em ambas as células-tronco testadas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados, em nenhum dos testes ($p > 0.05$). Legenda dos grupos: SCI – lesado sem tratamento, EST 10min após - grupo lesado e tratado com células-tronco embrionárias 10 minutos após a lesão, EST 7dias após - grupo lesado e tratado com células-tronco embrionárias 7 dias após a lesão, MSCT 10min após – lesado e tratado com células-tronco mesenquimais 10 minutos após a lesão e MSCT 7dias após – lesado e tratado com células-tronco mesenquimais 7 dias após. Total de animais analisados por grupo = 5.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da lesão

Um dos objetivos das pesquisas em lesão medular, é entender os eventos pós-lesão para minimizar os danos ou talvez estabelecer estratégias para reparar os danos. Neste estudo, nós descrevemos um método simples e barato de produzir um modelo compressivo de lesão medular experimental em camundongos, por meio de um clipe vascular. Este modelo de compressão da medula espinal causa uma lesão padronizada, eficiente e reprodutível, tanto nos resultados funcionais quanto morfológicos.

Não há no momento nenhum modelo simples ou bem definido que reproduza toda a complexidade da severidade de uma lesão medular. Um procedimento experimental bastante utilizado atualmente é a contusão da medula espinal (Kwon et al., 2002; Basso, 2004; Rosenzweig e McDonald, 2004) que reproduz parcialmente a situação encontrada em humanos após lesão. Porém, com esta abordagem não é possível interromper tratos espinais específicos, da maneira como pode ser realizada através dos modelos de transecção completa ou parcial. Apesar dos modelos de transecção total ou parcial apresentarem vantagens em relação à reprodutibilidade e seletividade da lesão, são modelos menos pertinentes do ponto de vista clínico (Basso et al., 1996). No entanto, a hemiseção é um modelo útil para comparar respostas celulares ipsi e contralaterais à lesão.

Uma revisão extensa de estudos experimentais aponta a paraplegia permanente, induzida em ratos e camundongos, como um parâmetro adequado para o estabelecimento do modelo experimental. Cada modelo de lesão reproduz um

aspecto particular do dano que ocorre após lesão medular em humanos. Por isso, é de grande importância clínica o desenvolvimento de novas estratégias para produzir lesão medular em animais, que permitam a avaliação, com abordagens funcionais e morfológicas, das funções sensoriais e motoras, e que permitam testar estratégias terapêuticas regenerativas para promover ajuda aos pacientes. Vários investigadores têm usado cliques para produzir lesão medular em ratos (Rivlin e Tator, 1978; Fehlings e Tator, 1995; von Euler et al., 1997), e em camundongos (Joshi e Fehlings, 2002; Faulkner et al., 2004). Estes modelos produzem uma lesão consistente em diferentes níveis da medula espinal, tais como, cervical (Casha e Fehlings, 2001), torácica (Poon et al., 2007) ou lombar (Park e Tator, 1998). O modelo de impacto-compressão com o clipe tem sido usado por diferentes grupos para examinar eventos degenerativos e regenerativos (Nashimi e Fehlings, 2001; Weaver et al., 2001; Faulkner et al., 2004; Karimi-Abdolrezaae et al., 2006; Saadoun et al., 2008).

Rivlin e Tator (1978) descreveram o primeiro modelo animal de lesão por compressão e descreveram o padrão de injúria após lesão medular traumática aguda. Neste modelo, a medula do rato foi exposta por laminectomia, e a compressão extradural foi executada usando um clipe de aneurisma Kerr-Lougheed (Rivlin e Tator, 1978). Este clipe exerce uma força bidirecional simultânea nas superfícies ventral e dorsal na medula espinal, quando as lâminas são fechadas no plano antero-posterior. Isto simula os mecanismos comuns da lesão medular em humanos, tais como, fratura-deslocamento e cisalhamento-compressão (Dolan e Tator, 1979; Poon et al., 2007). O clipe vascular que nós usamos é fechado ao redor da medula espinal no plano vertical, e exerce uma força bidirecional latero-lateral. Apesar das diferenças na forma como o clipe é fechado ao redor da medula,

nossos resultados funcionais e morfológicos são compatíveis com os descritos na literatura para cliques que comprimem no plano antero-posterior (Khan e Griebel, 1983; Poon et al., 2007). Cliques com oclusão no plano vertical também foram usados por von Euler e colaboradores (1997). Em seu estudo, eles usaram um clipe do tipo Buldogue para produzir lesão medular compressiva em ratos, e os resultados deles foram semelhantes aos descritos para o clipe com oclusão antero-posterior. Nossos resultados são semelhantes aos descritos nos estudos de von Euler, e por isso podem ser aplicados em camundongos.

Vários investigadores descreveram os dados histológicos após lesão medular por compressão (Dolan et al., 1980; Khan e Griebel, 1983; Faulkner et al., 2004), e nossos resultados foram bastante similares a estes estudos. O modelo de compressão por clipe produz mudanças histopatológicas que são bastante parecidas com a lesão medular em humanos, devido a uma combinação de contusão e danos da compressão (Dolan e Tator, 1979). Em nosso modelo experimental em camundongos, a lesão primária também inclui elementos de contusão e compressão. A contusão é causada na fase inicial pelo impacto do fechamento das lâminas do clipe ao redor do tecido da medula espinal. O mecanismo de compressão entre as lâminas fechadas é óbvio. A contusão causa lesão mecânica imediata com ruptura da estrutura do tecido e hemorragia, e a compressão produz deslocamento temporário do tecido e isquemia.

Este mecanismo de lesão simula a situação clínica de um paciente humano durante o trauma espinal, no qual fragmentos vertebrais são vigorosamente impelidos no canal espinal (contusão), produzindo como consequência a compressão da lesão espinal. A extensão das lesões secundárias em humanos e em nosso modelo animal, é determinada por vários fatores, como a força da lesão, o

tempo da isquemia e reperfusão devido à duração da compressão, e pela habilidade do organismo em reparar o dano. Enquanto a força exata ou duração do impacto traumático na medula espinal raramente é conhecida em humano, estes parâmetros são relativamente bem controlados em nosso modelo animal.

Animais lesados com o modelo de compressão por clipe ficam completamente paraplégicos. Abaixo do nível da lesão, os membros ficam flácidos, e nenhuma resposta de retirada é obtida por estímulo das patas. Não há micção espontânea, e a bexiga precisa ser esvaziada manualmente, três vezes ao dia, até a função da bexiga ser recuperada (Joshi e Fehlings, 2002). Nossos camundongos lesados mostraram comprometimento funcional semelhante ao descrito após compressão pelo clipe vascular. Resultados morfológicos também concordam com a maioria dos dados histopatológicos descritos em lesão medular (Kakulas, 1984). De acordo com Khan e Griebel (1983), as lesões geradas pelo modelo de compressão por clipe vascular foram muito mais consistentes com respeito à recuperação clínica do que as lesões produzidas pelo método de queda de peso. Por isso nosso modelo por compressão parece ser apropriado para experimentação terapêutica e análise da regeneração.

Outra vantagem no modelo com clipe é que a severidade da lesão pode ser variada intencionalmente por mudanças em duas variáveis, a força do clipe ou o tempo de compressão ao redor da medula espinal (Dolan e Tator, 1979). Estas variações produzirão danos com diferentes níveis de severidade (Dolan et al., 1980). Além disso, este modelo é simples e facilmente reproduzível em pequenos roedores (Dolan et al., 1980). Baseado em estudos prévios (Dolan e Tator, 1980; Joshi e Fehlings, 2002; Karimi-Abdolrezaee et al., 2006; Poon et al., 2007), nós escolhemos o tempo de 1 minuto para compressão da medula espinal, e nossos resultados

mostraram que este tempo de compressão foi suficiente para causar danos severos à medula espinal, que resultaram em paraplegia.

Nossos resultados morfológicos indicam que este é um modelo adequado em termos da produção de uma lesão severa na medula espinal. Após a compressão, nós observamos uma área grande de hemorragia e edema tecidual, os quais foram descritos por muitos outros investigadores como as respostas traumáticas iniciais (Saadoun et al., 2008). A análise por microscopia eletrônica nos permitiu descobrir a presença de vasos rompidos, rodeado por área esvaziada, provavelmente como resultado da reorganização tecidual após extravasamento do sangue da luz do vaso para o espaço extracelular. Lesões traumáticas iniciais têm sido descritas como dano mecânico que promove ruptura dos tratos e morte celular (neurônios, oligodendrócitos e células endoteliais). Em nosso modelo, houve perda de neurônios e a presença de células TUNEL-positivas no epicentro da lesão. Grandes áreas de desmielinização foram observadas após injúria, as quais podem ocorrer como consequência da morte de oligodendrócitos ou degradação da mielina após degeneração Walleriana.

A observação da medula espinal ao microscópio eletrônico nos animais submetidos a injúria, revelou a presença de pequenas cavidades no parênquima medular. Estas cavidades eram rodeadas por prolongamentos hipertróficos de astrócitos preenchidos por feixes de filamentos intermediários, semelhante ao que foi descrito em ratos, nos quais apenas uma grande cavidade é formada (Reier, 2004). Até onde nós sabemos, este é o primeiro relato ultra-estrutural das pequenas cavidades observadas em camundongos após lesão medular. Embora nós tenhamos confirmado a participação dos astrócitos ao redor das microcavidades em

camundongos, a razão pela qual estes animais diferem no número e no tamanho das cavidades ainda precisa ser esclarecido.

Análises quantitativas de nossos dados mostraram perda da substância branca nos animais lesados, e este achado foi adequadamente correlacionado com a perda funcional observada. A quantidade de substância branca preservada é comumente usada em lesão medular experimental para avaliar a severidade da lesão porque se correlaciona adequadamente com a função locomotora (Bresnahan et al., 1991; Ma et al., 2001; Scheff et al., 2003; Basso et al., 2006; Poon et al., 2007). Semelhante a outros investigadores, nós detectamos uma correlação significativa entre a quantidade de substância branca preservada e a função locomotora. Animais lesados apresentaram uma recuperação funcional espontânea, apesar de limitada, após a lesão. Porém, esta recuperação parecia alcançar um platô com aproximadamente 4 semanas. Outros autores também reportaram esta melhora espontânea e tendência a um platô de recuperação neste mesmo período, independente do modelo de lesão experimental usado (von Euler et al., 1997; Scheff et al., 2003; Basso et al., 2006). Entre a 4^a e a 6^a semana após lesão, nós observamos atrofia e deformidades, provavelmente devido à imobilidade persistente depois da lesão.

O grau de preservação da substância branca é provavelmente o responsável pela maior recuperação funcional nestes animais lesados. Em nosso estudo, nós descobrimos evidências de mielinização dos axônios preservados, por oligodendrócitos e por células de Schwann. Isto provavelmente está relacionado à resposta de recuperação espontânea.

A maioria dos estudos do comportamento funcional após lesão medular normalmente se baseia em testes locomotores com escores subjetivos, tais como,

BBB e BMS (Coutts e Keirstead, 2008). Nossos testes funcionais incluem a BMS, como a maior parte dos outros estudos, mas também introduz um novo teste não subjetivo, denominado por nós de teste de mobilidade global, baseado na habilidade do animal em caminhar livremente ao redor do campo aberto. Este tipo de avaliação tem a vantagem de prover uma análise quantitativa e não subjetiva do resultado locomotor, o qual pode ser complementar a BMS e, mais importante, pode ser executado por um investigador não treinado.

Como conclusão, nós descrevemos aqui um método simples e seguro de induzir lesão medular em camundongos, que poderá ser aplicado em procedimentos de estudos experimentais futuros com estratégias terapêuticas regenerativas.

5.2 Terapia Celular

Nossos resultados mostraram que o tratamento com células-tronco, embrionárias ou adultas, promoveu melhora funcional após lesão medular. O tratamento agudo ou subagudo após lesão medular compressiva melhorou significativamente a performance locomotora destes animais, além de aumentar significativamente a quantidade de substância branca e fibras normais preservadas quando comparado aos animais lesados sem terapia celular.

Diferentemente do sistema nervoso periférico (SNP) que apresenta regeneração nervosa após a lesão, o sistema nervoso central (SNC) tem uma regeneração abortiva. David e Aguayo (1981) mostraram um crescimento axonal, por longa-distância, de neurônios intrínsecos do SNC na presença de microambiente apropriado de tecido do SNP, mas este crescimento parou logo após a entrada dos axônios no ambiente de SNC. Mudanças no microambiente do tecido nervoso após

lesão, incluem liberação de moléculas inibitórias oriundas da mielina central, assim como os proteoglicanos associados com a cicatriz astrogliar. Estas mudanças limitam a reorganização espontânea das vias neurais e abortam a regeneração efetiva (Bregman et al., 1995; Camand et al., 2004; Fischer et al., 2004; Yiu e He, 2006). Avanços básicos nas pesquisas sobre lesão e regeneração do SNC conduziram a uma variedade de terapias experimentais que permitem crescimento axonal e brotamento efetivo (Bradbury et al., 2002; GrandPre et al., 2002; Reier, 2004; Arataki et al., 2005; Bradbury e McMahon, 2006; Schwab et al., 2006). Estas abordagens objetivam diminuir a progressão dos eventos secundários, reposição do tecido perdido, e aumento do potencial regenerativo intrínseco das células progenitoras endógenas. Entre estas intervenções, abordagens baseadas em terapia celular têm o maior potencial terapêutico para o reparo funcional da lesão medular, porque elas envolvem ambas abordagens regenerativas e repositoras (Myckatyn et al., 2004; Nistor et al., 2005; Martino e Pluchino, 2006). Células-tronco podem substituir células perdidas, e prover fatores neurotróficos e substratos necessários para a regeneração do SNC (Liu et al., 2000; Reier, 2004; Roskams e Tezlaff, 2005).

Diferentes tipos celulares têm sido usados como estratégias terapêuticas após lesão do SNC. Células-tronco embrionárias têm sido usadas como uma fonte de células neuronais em vários estudos baseados em reposição celular (Correia et al., 2005; Sonntag e Sanchez-Pernaute 2006; Wang et al., 2006; Zeng e Rao 2006) promovendo algum nível de recuperação locomotora em modelo animal de hemiplegia (McDonald et al., 1999; Chiba et al., 2003; McDonald et al., 2004).

Em relação ao transplante de células-tronco embrionárias é interessante destacar a questão do grau de diferenciação ideal. Enquanto alguns pesquisadores

diferenciam estas células (Nistor et al., 2005; Keirstead et al., 2005); outros defendem que uma restrição da linhagem até a fase de progenitor desta, já seria bastante para limitar a formação de tumores, mantendo uma melhor resposta ao microambiente e a capacidade aumentada de integração (Coutts e Keirstead, 2007).

Células-tronco embrionárias tratadas com ácido retinóico são comprometidas com a linhagem neural (Liu et al., 2000; Nistor et al., 2005; Nishikawa et al., 2007). Alguns estudos já descreveram o transplante destas células pré-diferenciadas com ácido retinóico, sem, no entanto avaliar a ultraestrutura delas antes do transplante nem o seu padrão de remielinização várias semanas após este (McDonald et al., 1999). Neste trabalho, nós diferenciamos células-tronco embrionárias em progenitores neurais com um protocolo de tratamento 2-/4+ com ácido retinóico (Bibel et al., modified protocol, 2007) e analisamos a ultra-estrutura do epicentro da lesão após transplante, comparando com outros grupos lesados, e correlacionando com a melhora funcional.

O emprego de células-tronco mesenquimais permite transplantes autólogos e dispensa a necessidade de imunossupressão. Isto torna esta terapêutica muito viável clinicamente aos pacientes, e também é de custo mais baixo. Estas células podem ser isoladas de vários tecidos humanos, tais como, medula óssea (Prockop, 1997), tecido adiposo (Zuk et al., 2002), fígado e sangue fetal (Campagnoli et al., 2001). As células-tronco mesenquimais diferenciam-se principalmente em linhagens de células mesodermiais, porém com condições e estímulos adequados do meio, elas podem exibir transdiferenciação e plasticidade (Abderrahim-Ferkoune et al., 2004; Tao e Ma, 2003). Estas células multipotentes podem também diferenciar em linhagens não mesenquimais, tais como, astrócitos (Kopen et al. 1999), neurônios

(Woodbury et al., 2000; Deng et al., 2001; Lee et al. 2003) e células mielinizantes (Dezawa et al., 2001; Tohill et al., 2004; Keihoff et al., 2006; Akiyama et al., 2002). Neste trabalho nós utilizamos células mesenquimais da medula óssea e analisamos a ultra-estrutura do epicentro da lesão após transplante, comparando com os outros grupos estudados, e correlacionando com a melhora funcional.

Uma importante questão em termos de terapia celular é a viabilidade e destino das células enxertadas. Em nossos experimentos, foi possível detectar no epicentro da lesão, e rostral e caudal a esta área, 56 dias após o transplante, as células embrionárias marcadas com Cell Tracer® e as células mesenquimais GFP⁺. Este achado apóia a suposição que as células podem sobreviver e interagir com o tecido hospedeiro, elevando a possibilidade que a melhora da função e da quantidade de substância branca preservada, como observado nesses grupos tratados com células, esteja direta ou indiretamente relacionados à presença destas células e/ou benefícios fornecidos por elas. Em concordância com os nossos resultados, vários investigadores descreveram a capacidade destas células-tronco para sobreviver por longos períodos e interagir com o tecido hospedeiro após transplante (Lee et al., 2003; Keirstead et al., 2005; Cízkova et al., 2006; Keilhoff et al., 2006a).

No presente trabalho, nós usamos um modelo experimental de lesão medular por compressão (Marques et al, 2008) seguro e reprodutível. Este modelo mantém a continuidade da medula espinal e permite a avaliação da recuperação funcional após o tratamento. Análises quantitativas de nossos dados mostraram uma maior preservação da substância branca e maior número de fibras nervosas mielinizadas nos animais MSCT e EST, quando comparados aos outros grupos lesados. Os animais EST, que apresentaram maior desempenho funcional, também

apresentaram maior preservação destas áreas. A mielinização tem um papel crucial nas doenças neurodegenerativas e traumáticas e nos processos regenerativos. Geralmente, remielinização e conseqüente restauração da função podem ser alcançadas através do estímulo aos mecanismos de reparo endógeno ou fornecendo uma fonte exógena de células mielinizantes, como nas terapias celulares (Keilhoff et al., 2006a). A quantidade de substância branca preservada está freqüentemente relacionada à severidade da lesão medular experimental, por causa da apropriada correlação com a função locomotora (Bresnahan et al., 1991; Fehlings e Tator, 1995; Ma et al., 2001; Scheff et al., 2003; Basso et al., 2006; Karimi-Abdolrezaae et al., 2006). O resultado funcional final está diretamente relacionado com a extensão dos tratos nervosos mielinizados preservados (Ronsyn et al., 2008) e/ou a própria remielinação axonal eficiente dos axônios poupados, resultando em uma melhor função locomotora em modelos experimentais de lesão medular.

Em suma, nossos resultados estão de acordo com os descritos pela literatura, os quais fazem correlação entre a quantidade de substância branca e os resultados funcionais apresentados. Este achado é apoiado por vários investigadores que mostraram a habilidade de células-tronco embrionárias para diferenciar em oligodendrócitos (Liu et al., 2000; Myckatyn et al., 2004; Keirstead et al., 2005; Nistor et al., 2005). Estes oligodendrócitos novos podem ser responsáveis pelo remielinização dos axônios que perderam a bainha de mielina devido à morte dos oligodendrócitos. Alguns estudos apontam também para a capacidade das células-tronco mesenquimais se diferenciarem em células mielinizantes (Keilhoff et al., 2006a; Keilhoff et al., 2006b) e participarem da remielinização axonal após lesão.

Por nós termos achado células de Schwann remielinizando axônios preservados, estas células também poderiam ser responsáveis pelo aumento da

substância branca e pelo melhor resultado funcional observados em nossos animais EST e MSCT. As células de Schwann podem vir do SNP ou da diferenciação direta das células transplantadas (Akiyama et al., 2002; Keilhoff et al., 2006a). Contudo, nós não podemos descartar a possibilidade que células de Schwann e/ou oligodendrócitos tenham surgido a partir das células-tronco do nicho subventricular, como previamente demonstrado em outros trabalhos (Keirstead et al., 1999; Akiyama et al., 2001; Chen et al., 2004). Estudos eletrofisiológicos mostraram que axônios remielinizados tanto por células de Schwann quanto por oligodendrócitos podem conduzir os potenciais de ação corretamente (Akiyama et al., 2002). No entanto, a mielina periférica tem a vantagem de não apresentar as propriedades antigênicas do oligodendrócito nem as proteínas antiregenerativas da mielina central. Por isso, a participação de células de Schwann na remielinação de axônios preservados pode ter tido um efeito positivo na melhora funcional nos animais com terapia celular.

Outra possível explicação para a maior área de preservação da substância cinzenta e melhor resultado funcional em nossos grupos tratados com células-tronco, principalmente no grupo tratado com células embrionárias, é que estas células possam liberar fatores neurotróficos que ou resgatariam os axônios da degeneração Walleriana após a lesão, ou aumentaria o crescimento axonal dos neurônios sobreviventes. Sob a influência das células-tronco transplantadas, os neurônios e axônios poderiam sobreviver e formar novas conexões que melhoraram a função (Cummings et al., 2005). Nossos resultados de ME apontam para esta hipótese, porque nós pudemos observar muitas fibras nervosas mielinizadas, e neurônios com aparência saudável, fazendo contato sináptico típico, nestes animais que receberam as células. Porém, nós não podemos afastar a possibilidade que a

recuperação funcional tenha sido, pelo menos em parte, devido à plasticidade das regiões infralesionais da medula (Lapointe et al., 2007). Estudos prévios demonstraram a existência do gerador central de padrão (CPG), grupo de neurônios localizados nos segmentos lombares (L1-L2) da medula espinal de camundongos (Nishikumar e Kudo, 2000). Estes neurônios, que apresentam excitação rítmica própria, podem gerar movimentos das patas traseiras na ausência completa de influência descendente, como no caso de transecção total da medula espinal (Lapointe et al., 2007). Após a lesão medular há um aumento na expressão de genes iniciais imediatos (IEG, do inglês immediate early genes), como c-jun e nor-1, fatores neurotróficos e outros, em áreas abaixo do nível da lesão que poderiam excitar os neurônios do CPG dando origem a movimentos dos membros (Lapointe et al., 2007).

No grupo EST, a análise ultraestrutural dos axônios que sofreram remielinização revelou um achado intrigante. Alguns axônios foram remielinizados por células que tinham fenótipo de células de Schwann, particularmente na maneira pela qual elas estavam contatando os axônios. Porém, estas células apresentavam citoplasma mais claro que as células de Schwann típicas, que poderiam ser observadas nas áreas vizinhas, e faltava a elas formação de uma lâmina basal visível que é um diferencial estrutural destas células de Schwann. Nós sugerimos que estas células não são originadas de células do SNP, mas sim das células enxertadas por nós ou das células-tronco endógenas do nicho subventricular. Uma explicação alternativa é a possibilidade que estas células sejam muito jovens e por isso não desenvolveram uma lâmina basal típica.

É necessário o uso de um teste funcional adequado para avaliar a recuperação funcional após a lesão. Nossa avaliação funcional incluiu a BMS e o teste de

mobilidade global. A BMS foi desenvolvida para avaliar o retorno da função locomotora em camundongos (Basso et al., 2006), e é sensível e segura para descobrir diferenças discretas entre os grupos analisados. Porém, como a BMS é um teste subjetivo, está suscetível a erros. Desta forma, nós decidimos usar um teste não subjetivo para conferir nossos resultados em termos de locomoção e recuperação funcional. O teste de mobilidade global (Marques et al., in press), tem a vantagem de permitir a análise não subjetiva e quantitativa do resultado locomotor. Esta avaliação nos permitiu medir o real ganho na habilidade do animal para caminhar livremente ao redor de um campo aberto, e também nos permitiu quantificar a velocidade e o desempenho locomotor global. Nossos resultados usando o teste não subjetivo de mobilidade global, confirmaram os dados obtidos pela análise pela BMS, sustentando a melhora funcional descrita. O grupo EST foi o único grupo experimental em que conseguimos realizar a quantificação no teste de impressão plantar, e este dado ressalta o grande benefício desta terapia celular neste modelo de lesão. Esta quantificação indicou uma diminuição no comprimento dos passos, das patas traseiras e dianteiras, conseqüentemente com um aumento do uso das patas anteriores. Estas modificações resultam provavelmente, de adaptações biomecânicas durante o ciclo de passos para permitir a locomoção após a restrição. Collazos-Castro e colaboradores (2006) observaram adaptações cinemáticas similares, nas patas dianteiras e traseiras, após lesões cervicais ou lombares, respectivamente. Nossos resultados apontam para a capacidade de compensação dos déficits funcionais da locomoção em quadrúpedes, utilizando ambos os membros, tanto o lesado, quanto o não lesado, de diferentes maneiras (Collazos-Castro et al., 2006). Apesar da diferença significativa no comprimento dos passos quando comparado ao grupo SHAM, não houve diferença estatística na

distância da base de suporte dos animais do grupo EST, indicando que a principal alteração biomecânica provavelmente não é realizada a partir da correção da base de suporte, como nos bípedes.

Animais do grupo EST mostraram, em ambos os testes funcionais utilizados, uma melhora estatisticamente significativa na recuperação locomotora comparada aos outros grupos. O grupo MSCT também apresentou melhora significativa no teste de mobilidade global em relação aos grupos lesados sem tratamento, porém sua performance ficou aquém do grupo EST. Os grupos lesados apresentaram recuperação limitada e restrita, com um padrão de estagnação após a entrada na fase crônica da lesão, com aproximadamente 4 semanas. Este desempenho dos animais não tratados foi muito semelhante ao descrito por alguns autores (Houle et al., 2003; Basso et al., 2006).

Vários autores tem descrito uma recuperação espontânea, com uma tendência para alcançar um platô com aproximadamente 4 semanas após lesão, independente do modelo experimental usado (von Euler et al., 1997; Scheff et al., 2003; Basso et al., 2006). Animais do grupo EST mostraram a melhor recuperação comparada aos outros grupos, porque alcançaram a fase final de recuperação locomotora pela BMS e desenvolveram maior velocidade de locomoção pelo teste de mobilidade global. Estes animais mantiveram uma recuperação progressiva, porém com certa tendência a diminuir o ritmo de evolução e alcançar um platô funcional com aproximadamente 42 dias após lesão e tratamento. Os animais do grupo MSCT apresentaram uma melhora funcional precoce, no 1º dia após lesão, e também alcançaram o platô de recuperação mais precocemente, entre o 28º e 35º dia após a lesão. Estes animais apresentaram aparente declínio da função após 6 semanas. Este fato pode sugerir que os efeitos benéficos destas células no sítio da

lesão possam não estar necessariamente envolvidos com sua diferenciação dentro de um tipo de tecido, mas sim com uma importante função como produtora local de fatores de crescimento, entre outros (Chamberlain et al., 2007), ou a seus atributos físicos, tais como, a capacidade de formar um caminho através do epicentro da lesão formando uma ponte para guiar a regeneração na medula espinal, como foi mostrado por Hofstetter e colaboradores (2002). Apesar do mecanismo de interação desta célula, vários autores já reportaram sua capacidade de ser atraída para a área da lesão (por fatores quimiotáticos que atraem estas células, Barbash et al., 2003) e de fazer “homing” nestas áreas lesadas mesmo quando administradas por via endovenosa, distante da área da lesão (Chen et al., 2001).

Houle e Tessler (2003) afirmam que a terapia celular quando realizada até 2 semanas após a lesão, portanto durante a fase subaguda, produz regeneração axonal e recuperação motora, porém se o tratamento ocorrer tardiamente, após 4 semanas, invariavelmente ocorre uma resposta negativa. Keirstead e colaboradores (2005) também observaram a diferença na resposta da mesma terapia celular quando o tratamento foi administrado na fase subaguda (7 dias após lesão) e na fase crônica (10 meses após lesão). Para tentar responder questões a respeito desta janela temporal ideal para a terapia celular, em relação à melhora da performance funcional do indivíduo tratado, nós realizamos os transplantes com os 2 tipos celulares estudados nos períodos agudo (10 minutos após lesão) e subagudo (7 dias após lesão) da lesão. Nossos resultados com o tratamento na fase aguda, para as duas células estudadas, apontam para um melhor desempenho funcional nestes animais, porém não houve diferença estatística entre os grupos. Nossos grupos tratados na fase subaguda, também apresentaram recuperação locomotora, porém esta foi mais limitada do que nos grupos agudos. Estes dados apontam para a

necessidade de maiores estudos a respeito da janela temporal ideal, da ação e interação destas células transplantadas e da possibilidade de intervenções terapêuticas associadas.

Realizamos comparações entre o emprego de células-tronco adultas mesenquimais e células-tronco embrionárias pré-diferenciada como progenitor neural. Não sabemos de outro estudo que tenha feito comparações entre células-tronco adulta e embrionária, usando um mesmo modelo de lesão, sujeito às mesmas variáveis e aos mesmos procedimentos para análise morfo-funcional. Apesar dos grupos tratados com as duas células analisadas apresentarem recuperação locomotora estatisticamente significativa em relação aos animais lesados sem tratamento, os animais tratados com as células-tronco embrionárias apresentaram uma performance estatisticamente superior ao grupo tratado com as células mesenquimais. Ambas as células têm sido testadas em outros modelos e apresentam capacidade de interação e diferenciação em outros tipos celulares e melhora na performance (Chen et al., 2001; Lee et al., 2003; Pereira-Lopes et al. 2006; Brustle et al., 1999; Kim et al., 2007). Podemos ressaltar algumas questões em relação as células-tronco embrionárias, elas têm uma grande capacidade de diferenciação e já foi descrito na literatura sua capacidade de formar célula glial e neurônio funcional in vitro (Fraichard et al., 1995; Liu et al. 2000) e in vivo (Kim et al. 2007; Liu et al. 2000). Além disso, as células usadas por nós foram comprometidas como precursores neurais, por isso, provavelmente elas apresentaram maior facilidade de interação e manutenção no tecido hospedeiro. Acreditamos que precisa ser testado um protocolo de pré-diferenciação em progenitor neural para as células mesenquimais, para que a comparação seja feita de forma mais adequada, isenta deste viés.

Em conclusão, neste estudo nós demonstramos o potencial terapêutico do transplante celular em lesão medular aguda e sua capacidade de promover recuperação funcional e aumentar a quantidade de substância branca e fibras nervosas preservadas após lesão do SNC. A aplicação deste tipo de transplante pode ser possível no futuro, em estudos experimentais, como estratégia terapêutica em humanos. A recuperação funcional encontrada, provavelmente está relacionada com a remielinização dos axônios preservados, ou com o resgate das fibras nervosas as quais poderiam ter sofrido degeneração axonal.

6 Conclusões

Nossos resultados neste trabalho nos levam às seguintes conclusões:

- O modelo experimental de lesão medular compressiva em camundongos que nós estabelecemos é simples, barato e confiável, com reprodutibilidade funcional e morfológica e boa validação.
- O teste de mobilidade global que nós estabelecemos é um teste funcional objetivo e quantitativo, que permite avaliar progressivamente a recuperação funcional dos animais submetidos a lesão medular.
- O transplante celular, com células-tronco embrionárias e adultas, apresenta potencial terapêutico após lesão medular aguda e promove recuperação funcional além de preservação da substância branca e das fibras nervosas.
- A qualidade da recuperação funcional pode estar relacionada com a linhagem de células-tronco utilizada para a terapia, e também com o tempo após lesão em que o transplante é realizado.
- A terapia celular com células-tronco embrionárias apresentou melhor resposta funcional que a terapia com células-tronco mesenquimais.

7 Perspectivas

Nossos resultados foram muito positivos e apresentaram vários desdobramentos para pesquisas futuras. Pretendemos investigar a capacidade de diferenciação destas células, embrionárias e mesenquimais, em células de tecido nervoso, e as possíveis interações entre tecido hospedeiro e estas células injetadas.

Continuaremos nosso trabalho comparativo testando outros tipos celulares, neste mesmo modelo e submetidos aos mesmos protocolos de avaliação. Tentaremos também observar a capacidade de diferenciação destas outras células-tronco e forma de interação com o tecido hospedeiro.

A reabilitação física é a única rotina bem estabelecida, como protocolo terapêutico, após lesão medular em humanos, e seus benefícios são descritos na literatura. Em nosso estudo, observamos recuperação funcional após terapia celular. Pretendemos associar a atividade física com esta terapia celular para analisar o somatório destes benefícios para o indivíduo tratado. Nosso objetivo será avaliar, em um estágio pré-clínico, esta melhora funcional, as janelas terapêuticas para o tratamento celular e o ingresso da reabilitação física; e esclarecer quais recursos fisioterápicos e quais células-tronco, em associação, apresentam melhores benefícios ao indivíduo tratado.

8 REFERÊNCIAS

- Abderrahim-Ferkoune, A., Bezy, O., Astri-Roques, S., Elabd, C, Ailhaud, G., e Amri, E.Z. (2004). Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: role of aortic carboxypeptidase-like protein. *Exp. Cell Res.*, 293, 219-228.
- Akiyama, Y., Honmou, O., Kato, T., Hashi, K., e Kocsis, J.D. (2001). Transplantation of clonal neural precursor cells from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 167, 27-39.
- Akiyama, Y., Radtke, C., e Kocsis, J.D. (2002). Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J. Neurosci.*, 22, 6623-6630.
- An, J.Y., Xu, L.A., Welsh, A.M., Hatfield, G., Hazel, T., Johe, K., e Koliatsos, V.E. (2007). Extensive neuronal differentiation of human neural stem cell grafts in adult rat spinal cord. *PLOS Medicine*, 4, 318-332.
- Anderberg, L., Aldskogius, H., e Holtz, A. (2007). Spinal cord injury – scientific challenges for the unknown future. *Uppsala J. Med. Soc.*, 112, 259-288.
- Arataki, S., Tomizawa, K., Moriwaki, A., Nishida, K., Matsushita, M., Ozaki, T., Kunisada, T., Yoshida, A., Inoue, H., e Matsu, H. (2005). Calpain inhibitors prevent neuronal cell death and ameliorate motor disturbances after compression-induced spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma*, 22, 398-406.
- Au, E., Richter, M.W., Vincent, A.J., Tetzlaff, W., Aebbersold, R., Sage, E.H., e Roskams, J. (2007). SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J. Neurosci.*, 27, 7208 –7221.
- Barbash, I.M., Chouraqui, P., Baron, J., Feinberg, M.S., Etzion, S., Tessone, A., Miller, L., Guetta, E., Zipori, D., Kedes, L.H., e Leor, J. (2003). Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 108, 863-868.
- Bareyre, F.M., e Schwab, M.E. (2003) Inflammation, degeneration, and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends in Neurosci.*, 23 (10), 555- 63.
- Basso, D.M. (2004). Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *J. Neurotrauma*, 21(4), 395-404.
- Basso, D.M., Beattie, M.S., e Bresnahan, J.C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma*, 12, 1-21.
- Basso, D.M., Beattie, M.S., e Bresnahan, J.C. (1996). Histological and motor studies of graded spinal cord contusion injury using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.*, 139, 224-56.

- Basso, D.M., Fischer, L.C., Anderson, A.J., Jakeman, L.B., McTigue, D.M., e Popovich, P.G. (2006). Basso mouse scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J. Neurotrauma*, 23 (5), 635-659.
- Beattie, M.S., Bresnahan, J.C. (2000). Cell death, repair and recovery of function after spinal cord contusion injuries in rats. In: Kalb RG and Strittmater SM (eds): *Neurobiology of spinal cord injury*. Human Press, Totowa, New jersey, pp. 1-21.
- Behrmann, D.L., Bresnahan, J.C., Beattie, M.S., e Shah, B.R. (1992). Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma*, 9,197–217.
- Bibel, M., Richter, J., Lacroix, E., e Barde, Y.A; (2007). Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Protoc.*, 2, 1034-1043.
- Biernaskie, J., Sparling, J.S., Liu, J., Shannon, C.P., Plemel, J.R., Xie, Y., Miller, F.D., e Tetzlaff, W. (2007) Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J. Neurosc.*, 27, 9545–9559.
- Bradbury, E.J., e McMahon, S.B. (2006) Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nat. Rev. Neurosc.*, 7, 644-653.
- Bradbury, E.J., Moon, L.D., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., e McMahon, S.B. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416, 636-640.
- Bregman, B.S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H.N., Gao, D., e Schwab, M.E. (1995). Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*, 378, 498-501.
- Bresnahan, J.C., Beattie, M.S., Stokes, B.T., e Conway, K.M. (1991). Three-dimensional computer-assisted analysis of graded contusion lesions in the spinal cord of the rat. *J. Neurotrauma*, 8, 91-101.
- Bresnahan, J.C., Beattie, M.S., Todd, F.D. III, e Noyes, D.H. (1987). A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp. Neurol.*, 95, 548-70.
- Brüstle, O., Jones, K.N., Learish, R.D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O.D., Duncan, I.D., e McKay, R.D.G. (1999). Embryonic Stem Cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, 285, 754-756.
- Camand, E., Morel, M-P., Faissner, A., Sotelo, C., e Dusart, I. (2004). Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *Europ. J. Neurosc.*, 20, 1161–1176.

- Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennet, P.R., Bellantuono, I., e Fisk, N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood*, 98, 2396-2402.
- Casella, G.T., Bunge, M.B., Wood, P.M. (2006). Endothelial cell loss is not a major cause of neuronal and glial cell death following contusion injury of the spinal cord. *Exp. Neurol.*, 202, 8-20.
- Casha, S., Yu, W.R., e Fehlings, M.G. (2001). Oligodendroglial Apoptosis Occurs along Degenerating Axons and is Associated with Fas and P75 Expression Following Spinal Cord Injury in the Rat. *Neurosci*, 103, 203-218.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton B., e Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation, capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25, 2739-2749.
- Chen, J., Li, Y., Wang, L., Lu, M., Zhang, X., e Chopp, M. (2001). Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J. Neurol. Sci.*, 189, 49-57.
- Chen, J., Magavi, S.S., e Macklis, J.D. (2004). Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *PNAS. USA*, 101, 16357-16362.
- Chiba, S., Iwasaki, Y., Sekino, H., e Suzuki, N. (2003). Transplantation of motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells improves motor function of hemiplegic mice. *Cell Transplant*, 12, 457-468.
- Cízková, D., Rosocha, J., Vanický, I., e Jergová, S. (2006). Transplant of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Molec. Neurobiol*, 26, 1167-1180.
- Claxton, A., Wong, D.T., Chung, F., e Fehlings, M.G. (1998). Predictors of hospital mortality and mechanical ventilation in patients with cervical spinal cord injury. *Can. J. Anaesth.*, 45, 144-149.
- Collazos-Castro, J.E., López-Dolado, E., e Nieto-Sampedro, M. (2006). Locomotor deficits and adaptive mechanisms after thoracic spinal cord contusion in the adult rat. *J. Neurotrauma.*, 23(1), 1-17.
- Correia, A.S., Anisimov, S.V., Li, J.Y., e Brundin, P. (2005). Stem cell-based therapy for Parkinson's disease. *Ann. Med.*, 37, 487-498.
- Coumans, J.V., Lin, T.T-S., Dai, H.N., MacArthur, L., McAtee, M., Nash, C., e Bregman, B.S. (2001). Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J. Neurosci.*, 21, 9334-9344.

- Coutts, M., e Keirstead, H.S. (2008). Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 209, 368-377.
- Cummings, B.J., Uchida, N., Tamaki, S.J., Salazar, D.L., Hooshmand, M, Summers, R., Gage, F.H., e Anderson, A.J. (2005). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *PNAS*, 39, 14069-14074.
- David, S., e Aguayo, A.J. (1981). Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214, 931-933.
- Deng, w., Obrocka, M., Fischer, I., e Prockop, D.J. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 148-152.
- Dezawa, M., Takahashi, I., Esaki, M., Takano, M., e Sawada, H. (2001). Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur. J. Neurosc.*, 14, 1771-1776.
- Dolan, E.J., e Tator, C.H. (1979). A new method for testing the force of clips for aneurysms of experimental spinal cord compression. *J. Neurosurg.* 51, 229-33.
- Dolan, E.J., Tator, C.H., e Endrenyi, L. (1980). The value of decompression for acute experimental spinal cord compression injury. *J. Neurosurg.*, 53, 749-55.
- Dunnett, S.B. (1999). The failure of axon regeneration in the CNS is not absolute. *NeuroReport*, 10, iii-iv.
- Faulkner, J.R., Hermann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., e Sofroniew, M.V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosc.*, 24, 2134-55.
- Fehlings, M.G., e Tator, C.H. (1995). The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 132, 220- 228.
- Fischer, D., He, Z., e Benowitz, L.I. (2004). Counteracting the nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J. Neurosc.*, 24, 1646-1651.
- Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P., e Samarut, J. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci.*, 108, 3181-3188.
- Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287, 1433-1438.
- Gensert, J.M., e Goldman, J.E. (1997). Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron*, 19, 197-203.

- GrandPre, T., Li, S. e Strittmatter, S. M. (2002). Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*, 417, 547–551.
- Gruner, J.A. (1992). A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J. Neurotrauma*, 9 (2), 123–26.
- Hagg, T., e Oudega, M. (2006). Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, 23 (3/4), 264-80.
- Harel, N.Y., Strittmatter, S.M. (2006). Can Regenerating Axons Recapitulate Developmental Guidance during recovery from Spinal Cord Injury. *Nat. Rev. Neurosc.*, 7, 603-616.
- Hayes, K.C., Kakulas, B.A. (1997). Neuropathology after Human Spinal Cord Injury Sustained in Sports-Related Activities. *J. Neurotrauma*, 14 (4), 235-48.
- Hofstetter, C.P., Schwarz, E.J., Hess, D., Widenfalk, J., ElManira, A., Prockop, D.J., e Olson, L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 2199-2204.
- Houle, J.D., e Tessler, A. (2003). Repair of chronic spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 2, 247-260.
- Joshi, M., e Fehlings, M.G. (2002). Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: part 1. clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J. Neurotrauma*, 19, 175-90.
- Joshi, M., e Fehlings, M.G. (2002). Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: part 2. quantitative neuroanatomical assessment and analysis of the relationships between axonal tracts, residual tissue, and locomotor recovery. *J. Neurotrauma*, 19,191-203.
- Kakulas BA. (1984). Pathology of spinal cord injuries. *Centr. Nerv. Sys. Trauma*, 1, 117-29.
- Kamencic, H., Griebel, R.W., Lyon, A., Paterson, P.G., e Juurlink, B.H.J. (2001). Promoting glutathione synthesis following spinal cord trauma decreases secondary damage and promotes retention of function. *FASEB J.*, 15, 243-50.
- Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E., Wang, J., Morshead, C.M., e Fehlings, M.G. (2006). Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J. Neurosc.*, 26, 3377–3389.
- Keilhoff, G., Goihl, A., Langnase, K., Lansa, H., e Wolf, G. (2006). Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur. J. cell Biol.*, 85, 11-24. (a)

- Keilhoff, G., Stang, F., Goihl, A., Wolf, G., e Fansa, H. (2006). Transdifferentiated mesenchymal stem cells as alternative therapy in supporting nerve regeneration and myelination. *CellMol. Neurobiol.*, 26 (7-8), 1235-1252. (b)
- Keirstead, H.S., Ben-Hur, T., Rogister, B., O'Leary, M.T., Dubois-Dalcq, M., e Blakemore, W.F. (1999). Polysialylated neural cell adhesion molecule-positive CNS precursors generate both oligodendrocytes and Schwann cells to remyelinate the CNS after transplantation. *J. Neurosci.*, 19, 7529-7536.
- Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., e Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, 25, 4694-4705.
- Khan, M., e Griebel, R. (1983). Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can. J. Neurol. Sci.*, 10, 161-65.
- Khan, M., e Griebel, R. (1983). Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can. J. Neurosci.*, 10, 161-165.
- Kim, D-Y., Park, S-H., lee, S-U., Choi, D-H., Park, H-W., Paek, S.H., Shin, H.Y., Kim, E-Y., Park, S-P., e Lim, J.H. (2007). Effects of human embryonic stem cell-derived neuronal precursor cell transplantation into cerebral infarct model of rat with exercise. *Neurosc. Res.*, 58, 164-175.
- Kluver, H., e Barrera, E. (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 12, 400-403.
- Kopen, G.,C., Prockop, D.J., e Phinney, D.G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10711-10716.
- Kunkel-Bagden, E., Dai H-N., e Bregman, B.S. (1993). Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.*, 119, 153-64.
- Kwon, B.K., Oxland, T.R., e Tetzlaff, W. (2002). Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine*, 27 (14), 1504-10.
- Kwon, B.K., Tetzlaff, W., Grauer, J.N., Beiner, J., e Vaccaro, A.R. (2004). Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.*, 4 (4), 451-464.
- Lapointe, N.P., Ung, R-V., e Guertin, P.A. (2007). Plasticity in sublesionally located neurons following spinal cord injury. *J. Neurophysiol.*, 98, 2497-2500.
- Lee, J., Kuroda, S., Shichinohe, H., Ikeda, J., Seki, T., Hida, K., Tada, M., Sawada, K-I., e Iwasaki, Y. (2003). Migration and differentiation of nuclear fluorescence-

labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology*, 23, 169-180.

Lim, J-H., Byeon, Y-E., Ryu, H-H., Jeong, Y-H., Lee, Y-W., Kim, W.H., Kang, K.S., e Kweon, O-K. (2007). Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J. Vet. Sci.*, 8, 275-282.

Liu, S., Qu, Y., Stewart, T.J., Howard, M.J., Chakraborty, S., Terrence, F., Holekamp, T.F., e McDonald, J.W. (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *PNAS*, 97, 6126–6131.

Ma, M., Basso, D.M., Walters, P., Stokes, B.T., e Jakeman, L.B. (2001). Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the c57bl/6 mouse. *Exp. Neurol.*, 169, 239-254.

Magavi, S.S., Leavitt, B.R., e Macklis, J.D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 405, 951-955.

Marques, S. A., Garcez, V., Del Bel, E., e Martinez, A.M.B. (2008). A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal-cord injury in mice: functional and morphological assessments. *J. Neurosci. Meth.* (in press).

Martino, G., e Pluchino, S., (2006). The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosc.*, 7, 395-406.

McDonald, J.W., Becker, D., Holekamp, T.F., Howard, M., Liu, S., Lu, A., Platik, M.M., Qu, Y., Stewart, T., and Vadivelu, S. (2004). Repair of the injured spinal cord and the potential of embryonic stem cell transplantation. *J. Neurotrauma*, 21,383-393.

McDonald, J.W., e Sadowsky, C. (2002). Spinal cord injury. *Lancet*, 359,417-425.

McDonald, J.W., Liu, X.Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S.K., Turetsky, D., Gottlieb, D.I., e Choi, D.W. (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.*, 5,1410-1412.

Myckatyn, T.M., Mackinnon, S.E., e McDonald, J.W. (2004). Stem cell transplantation and other novel techniques for promoting recovery from spinal cord injury. *Transplant Immunol.*, 12, 343-358.

Nashimi R, e Fehlings MG. Changes in Axonal Physiology and Morphology After Chronic compressive Injury Of The Rat Thoracic Spinal Cord. *Neurosc.*, 2001; 104: 235-51.

Nishikawa, S-I., Jakt, L.M., e Era, T. (2007). Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. *Nat. Rev. Neurosc.*, 8, 502-507.

- Nishikumar, H., e Kudo, N. (2000). Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse. *Brain Res. Bull.*, 53, 661-669.
- Nistor, G.I., Totoui, M.O., Haque, N., Carpenter, M.K., e Keirstead, H.S. (2005). Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinated after spinal cord transplantation. *Glia*, 49, 385-396.
- Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., e Okano, H. (2004). Retinoic-acid-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Development. Biol.*, 275, 124-142.
- Park, E., Velumian, A.A., e Fehlings, M.G. (2004). The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J. Neurotrauma*, 21, 754-74.
- Park, Y.K., e Tator, C.H. (1998). Prevention of arachnoiditis and postoperative tethering of the spinal cord with gore-tex surgical membrane: an experimental study with rats. *Neurosurg.*, 42, 813-23.
- Pearson, K.G. (2001). Could enhanced reflex function contribute to improving locomotion after spinal cord repair?. *J. Physiol.*, 533, 75-81.
- Pereira-Lopes, F.R., Moura Campos, L.C., Correa Jr, J.D, Balduino, A., Langone, F., Lora, S., Borojevic, R., e Martinez, A.M.B. (2006). Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp. Neurol.*, 198 (2), 457-468.
- Poon, P.C., Gupta, D., Shoichet, M.S., e Tator, C.H. (2007). Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries. *Spine*, 32 (25), 2853-59.
- Popovich, PG. (2000). Immunological regulation of neuronal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Prog. Brain.Res.*, 128,43-58.
- Priebe, M.M., Chiodo, A.E., Scelza, W.M., Kirshblum, S.C., Wuermser, L-A, e Ho, C.H. (2007). Spinal cord injury medicine. 6. economic and societal issues in spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 88 (s1), s84-s88.
- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-74.
- Reier, P.J. (2004). Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and translational neurobiology. *J. Am. Soc. Exp. Neuro. Therapeut.*, 1, 424-451.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., e Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.*, 18, 399-404.

- Rice, T., Larsen, J., Rivest, S., e Yong, V.W. (2007). Characterization of the early neuroinflammation after SCI in mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 66, 184-195.
- Rivlin, A.S., e Tator, C.H. (1978). Effects of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg. Neurol.*, 10 (1), 38-43.
- Ronsyn, M.W., Berneman, Z.N., Van Tendeloo, V.F.I., e Ponsaerts, P. (2008). Can cell therapy heal a spinal cord injury?. *Spin. Cord*, 46, 532-539.
- Rosenzweig, E.S., e McDonald, J.W. (2004). Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. *Curr. Opin. Neurol.*, 17, 121-31
- Roskams, A.J., e Tetzlaff, W. (2005). Directing stem cells and progenitor cells on the stage of spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 193, 267-272.
- Saadoun, S.A., Verkman, A.S., e Papadopoulos, M.C. (2008). Greatly improved neurological outcome after spinal cord compression injury in AQP4-deficient mice. *Brain*, 131,1087-98.
- Scheff, S.W., Rabchevsky, A.G., Fugaccia, I., Main, J.A., e Lump, J.E. Jr. (2003) Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J. Neurotrauma*, 20, 179–193.
- Schwab, J.M., Bregt, K., Mueller, C.A., Faill, V., Kaps, H.P., Tuli, S.K., e Schluesener, H.J. (2006). Experimental strategies to promote spinal cord regeneration- an integrative perspective. *Progress in Neurobiol.*, 78, 91-116.
- Sekhon, L.H.S., and Fehlings, M.G. (2001). Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, 26 (24S), 2-12.
- Shi, R., e Pryor, J.D. (2002). Pathological changes of isolated spinal cord axons in response to mechanical stretch. *Neurosci.*, 110: 765-777.
- Sonntag, K.C., e Sanchez-Pernaute, R. (2006). Tailoring human embryonic stem cells for neurodegenerative disease therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, 7,14-618.
- Tao, H., e Ma, D.D. (2003). Evidence for transdifferentiation of human bone marrow-derived stem cells: recent progress and controversies. *Pathology*, 35, 6-13.
- Tator, C.H., e Fehlings, M.G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg.*, 75, 25-26.
- Tator, C.H. (1995). Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol.*, 5 (4), 407-413.

- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. e Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Thuret, S., Moon, L.D.F., e Gage, F.H. (2006) Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature*, 7, 628-643.
- Toft, A., Scott, D.T., Barnett, S.C., e Riddell, J.S. (2007). Electrophysiological evidence that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury. *Brain*, 130, 970-984.
- Tohill, M., Mantovani, C., Wilberg, M., e Terenghi, G. (2004). Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosc. Lett.*, 362, 200-203.
- von Euler, M., Seiger, A., e Sundstrom, E. (1997). Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp. Neurol.*, 145, 502-510.
- Wang, Q., Matsumoto, Y., Shindo, T., Miyake, K., Shindo, A., Kawanishi, M., Kawai, N., Tamiya, T., e Nagao, S. (2006). Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Med. Invest.*, 53,61-69.
- Weaver, L.C., Verghese, P., Bruce, J.C., Fehllings, M.G., Krenz, N.R., e Marsh D.R. (2001). Autonomic dysreflexia and primary afferent sprouting after clip-compression injury of the rat spinal cord. *J. Neurotrauma.*, 18, 1107- 19.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., e Black, I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosc. Res.*, 61, 364-370.
- Yiu, G., e He Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosc.*, 7, 617-627.
- Zeng, X., e Rao, M.S. (2007). Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neurosc.* 145,1348-1358.
- Zheng, B., Lee, J.K., e Xie, F. (2006). Genetic mouse models for studying of spinal axon regeneration. *Trends Neurosc*, 29, 640-46.
- Zhou, Q.J., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Hu, R.Z., Lu, Y.L., Yao, H., e Dai, L.C. (2005). Generation of embryoid bodies from mouse embryonic stem cell cultures on STO feeder cells. *Cell Biol. Int.*, 29, 817-825.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., DeUgarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., e Heidrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Moll. Biol. Cell*, 13, 4279-4295.

9 Apêndice

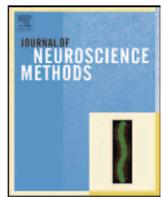
9.1 Apêndice A



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth



A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: Morphological and functional assessment

Suelen Adriani Marques^a, Valéria Ferreira Garcez^b, Elaine-Del Bel^b, Ana Maria Blanco Martinez^{a,*}

^a Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

^b Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Escola de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2008

Received in revised form 1 October 2008

Accepted 7 October 2008

Keywords:

Spinal cord injury
Global mobility
Basso mouse scale
Ultrastructure
Mice
Compression
Vascular clip

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) causes motor and sensory deficits that impair functional performance, and significantly impacts life expectancy and quality. Animal models provide a good opportunity to test therapeutic strategies *in vivo*. C57BL/6 mice were subjected to laminectomy at T9 and compression with a vascular clip (30 g force, 1 min). Two groups were analyzed: injured group (SCI, $n = 33$) and laminectomy only (Sham, $n = 15$). Locomotor behavior (Basso mouse scale—BMS and global mobility) was assessed weekly. Morphological analyses were performed by LM and EM. The Sham group did not show any morphofunctional alteration. All SCI animals showed flaccid paralysis 24 h after injury, with subsequent improvement. The BMS score of the SCI group improved until the intermediate phase (2.037 ± 1.198); the Sham animals maintained the highest BMS score (8.981 ± 0.056), $p < 0.001$ during the entire time. The locomotor speed was slower in the SCI animals (5.581 ± 0.871) than in the Sham animals (15.80 ± 1.166), $p < 0.001$. Morphological analysis of the SCI group showed, in the acute phase, edema, hemorrhage, multiple cavities, fiber degeneration, cell death and demyelination. In the chronic phase we observed glial scarring, neuron death, and remyelination of spared axons by oligodendrocytes and Schwann cells. In conclusion, we established a simple, reliable, and inexpensive clip compression model in mice, with functional and morphological reproducibility and good validity. The availability of producing reliable injuries with appropriate outcome measures represents great potential for studies involving cellular mechanisms of primary injury and repair after traumatic SCI.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Animal models provide an opportunity to test therapeutic strategies *in vivo*, and are an important step on the way to clinical application. In recent years, spinal injury models have become more sophisticated in their reproducibility, behavioral analysis and comprehension of various sensory, motor and autonomic consequences (Reier, 2004). Experimental SCI models can maintain the continuity of the spinal cord, as in the contusion (e.g., weight-fall) or compression models, or not, as in the partial- or complete-transection models. In humans, the majority of acute SCI traumatic injuries is not followed by complete transection, but there is a combination of contusion, compression and possibly partial transection (Kakulas, 1984). Post-mortem examination of patients, classified according

to criteria established by the American Spinal Cord Association (ASIA) as SCI functionally “complete” (grade A), i.e., no sensory or motor function below the level of injury, shows a small peripheral rim of spared axons (Hayes and Kakulas, 1997). A similar rim is also present in animal contusion and compression models (Bresnahan et al., 1987; Basso et al., 1996; Kamencic et al., 2001). The extradural clip compression injury model, as introduced by Rivlin and Tator (1978), simulates the clinical situation seen in the majority of human cases, and is less expensive than contusion models (Behrmann et al., 1992; Gruner, 1992; Scheff et al., 2003). However, the model selected must be appropriate to answer the questions raised by the researchers (Schwab et al., 2006).

Several models of SCI have been developed in small animals, mainly in rats. Genetically modified mice are widely used nowadays to study pathological events (Zheng et al., 2006; Saadoun et al., 2008), which would not have been possible in wild animals. Therefore, mouse models of SCI offer an advantage over other animal models, given the ease of testing the relationship between specific genetic mutations and the mechanisms that promote or prevent recovery (Basso et al., 2006).

* Corresponding author at: Av. Rodolfo Paulo Rocco, 255 – Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, F012 – Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Instituto de Ciências Biomédicas, 21941-913, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 21 25626431; fax: +55 21 25626480.

E-mail address: martinez@histo.ufrj.br (A.M.B. Martinez).

SCI causes motor and sensory deficits that impair functional performance, and has a significant impact on life expectancy and quality (Sekhon and Fehlings, 2001; Priebe et al., 2007). Although the survival rate has increased in recent years (to above 95%), these patients are subject to a lifelong handicap (Schwab et al., 2006). Nowadays, traumatic SCI and its devastating consequences represent one of the greatest challenges for those who work with nervous system degeneration and regeneration. Primary events after traumatic injury of CNS tracts are described as cell death (neurons, glia and endothelial cells) in the epicenter of the lesion, and stretching of axons, which can cause membrane damage, tract rupture and demyelination (Shi and Pryor, 2002). Secondary events, such as hemorrhage, hypoxia, edema, increase of free intracellular calcium, calpain activation, strong inflammatory response, astrogliosis, apoptosis, necrosis and excitotoxicity are triggered, and as a consequence progressively enlarge the primary area of lesion, in the rostral and caudal directions (Bareyre and Schwab, 2003; Park et al., 2004; Hagg and Oudega, 2006). Ascending and descending preserved tracts can, therefore, suffer further demyelination, mainly due to death or damage to oligodendrocytes, aggravating functional loss (Reier, 2004; Schwab et al., 2006).

In this study, we describe an effective experimental mice model that produces consistent SCI with little variability, and leads to reproducible histological and locomotor outcomes. We chose to use a compression model using a vascular clip with a known force of pressure to cause acute traumatic SCI; this injury simulates the clinical situation that is commonly observed in humans, and allows studies of functional spontaneous recovery. In this study, all the SCI animals showed complete hindlimb paralysis, with important functional deficits and histological alterations compatible with a moderately severe SCI.

2. Materials and methods

Our experimental study was approved by the Commission of Animal Care of the "Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro," under Protocol number DHEICB003.

2.1. Surgical procedure

Young adult female C57BL/6 mice were anesthetized by i.p. injection of a solution containing xylazine (15 mg/kg; Bayer, Brazil) and ketamine (100 mg/kg; Brazil), and then positioned on a cork platform. The skin was incised along the midline of the back, and the paravertebral muscles of the thoracic-level (T8-T10) vertebrae were dissected out. Laminectomy was performed at the T9 level under visual guidance, using an operating microscope (F104, OPTO, Brazil). One minute extradural compression with a vascular clip (with 30 g force, Kent Scientific Corporation, INS 14120, USA) was performed around the exposed spinal cord, in order to cause an acute-compression injury. Muscles and skin were sutured in layers, and an antibacterial spray was applied topically. Immediately after surgery, the animals were given a subcutaneous saline injection (1-2 mL) and prophylactic Baytril (2.5 mg/kg/d, s.c., Bayer, Brazil; Keirstead et al., 2005). They were left to recover on a warm pad until thermoregulation and an alert state was reestablished. They were then returned to their home cages, with free access to food and water. Animals received manual bladder expression twice daily until the return of bladder function; they also received appropriate veterinary care when needed. Two groups were analyzed: the injured group (SCI, $n = 33$) and the laminectomy group (Sham, $n = 15$).

2.2. Behavioral testing

We performed three types of tests: global mobility, locomotor performance and footprint. Prior to injury, all mice were acclimated and scored for each test used. Global mobility test was developed to detect locomotor improvement after SCI throughout the analyzed time. The animals were evaluated by videotape with a WebCam (5 frames per second, for 1 min, KMEX, USA) using the free K3CCD software. Quantification was performed by means of the JAVA software (Jandel Video Analysis Software, Jandel Scientific, USA; Kunkel-Bagden et al., 1993). The animals' locomotor performance was analyzed using the Basso mouse scale open-field score (BMS, Basso et al., 2006) because it is a valid locomotor rating scale for mice. The evaluations were made by two blind observers for all analyzed groups. Briefly, the BMS is a 9-point scale that provides a gross indication of locomotor ability and determines the phases of locomotor recovery and features of locomotion. Early phase of recovery shows the resolution of paralysis and/or paresis progressed from no ankle movement to larger ankle movement and this is related to a score of 0-2. Plantar placing and the development of stepping occur in the intermediate phase of recovery, which requires score 3-4. In the late phase of recovery, paw position during stance, hindlimb-forelimb coordination and trunk stability are analyzed (score 5-8). Score 9 indicates the normal locomotor mobility, with trunk stability and refined performance.

The score for each hindlimb was recorded as the average per animal (left and right hindlimb) to obtain one BMS score per mouse, and then the mean of the group was calculated. For these tests, the animals were evaluated before injury, 24 h after surgery, and then weekly up to 8 weeks post-injury. Qualitative analysis of the forelimb and hindlimb step was made using the footprint test before surgery, and at 56 days after SCI. The forelimb and hindlimb plantar surfaces were inked with non-toxic red and blue dyes, respectively, and the mice were allowed to walk on white paper towards a dark tunnel (Ma et al., 2001).

2.3. Histology

After 8 weeks, the animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), and perfused intracardially with a solution of 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Spinal cords were dissected in three segments (at the epicenter of the lesion, and rostrally and caudally to it) and processed for light microscopy (LM) and electron microscopy (EM). Some animals ($n = 16$) were killed 7 days after injury and processed for LM ($n = 12$) and EM ($n = 5$), to analyze acute events after SCI. The other animals ($n = 17$) were killed 56 days after surgery and processed in the same way. Sham animals were killed just at 56 days after surgery ($n = 15$). For LM, the spinal cord segments were embedded in OCT (Tissue Tek), and 10- μ m-thick serial cross-sections were obtained with a cryostat (Leica CM 1850, Germany; $n = 5$ for Sham group, $n = 6$ in SCI acute group and $n = 8$ in SCI chronic group) and collected on gelatin-coated glass slides. Longitudinal sections were used for qualitative analyzes ($n = 5$ for the three group analyzed). Sections were stained with Luxol Fast Blue (LFB), hematoxylin and eosin and Kluver-Barrera (LFB plus Nissl; Kluver and Barrera, 1953) to analyze white matter, injury site and neuron damage, respectively. Sections were observed under a Zeiss Axioscop 2 Plus Microscope and photographed with a Zeiss Axio-cam MRC camera, using the Axiovision program, version 4.5 (Zeiss) for image acquisition. For EM ($n = 5$ for each group), the spinal cord segments were post-fixed by immersion in cacodylate-buffered 1% osmium tetroxide with 0.8% potassium ferrocyanide for 7 h, at room temperature. Tissue was washed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), dehydrated through a graded acetone series, embedded in PolyBed

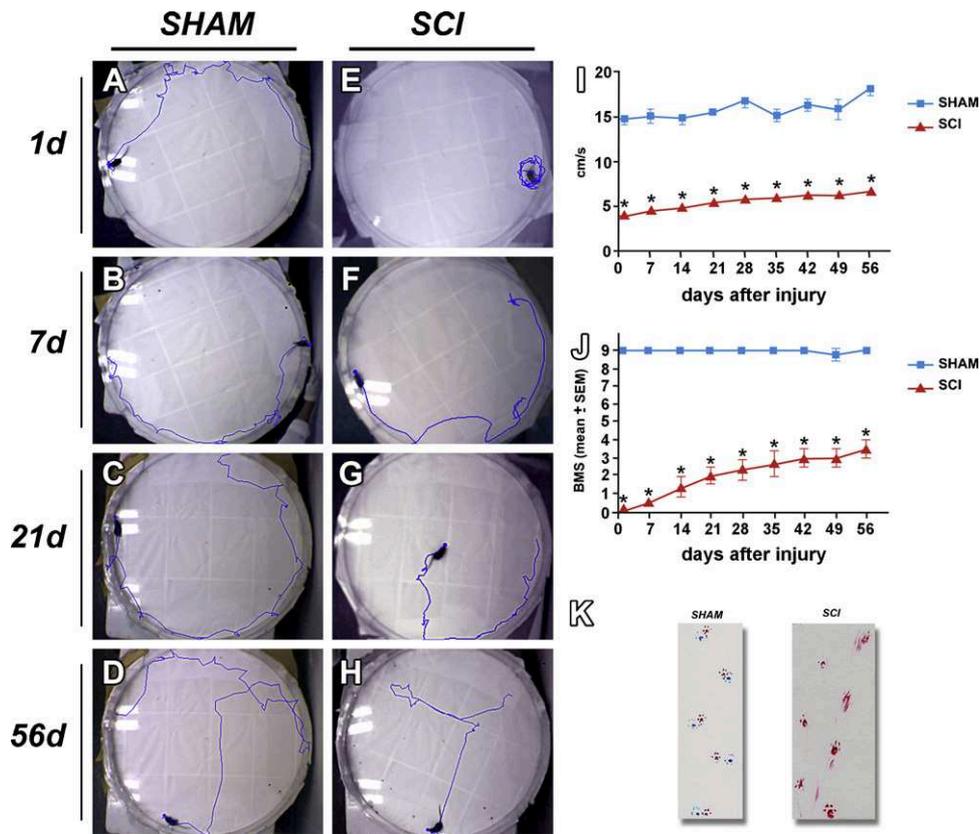


Fig. 1. Functional analyses. (A-I) Global mobility progression after surgery. (A-D) Progression of Sham group versus SCI group (E-H) at different times after surgery (1 day A and E, 7 days B and F, 21 days C and G, 56 days D and H). (I) Line graphs representing the progress of global mobility between the Sham group and the SCI group. Each point is a mean of the group, $p < 0.0001$. (J) Line graphs representing comparative Basso mouse scale open-field locomotion score between the Sham and SCI groups, $p < 0.0001$. (K) Qualitative footprint analysis shows forelimb footprints in red and hindlimb footprints in blue. The Sham group maintained step coordination, whereas the SCI group did not show any hindlimb prints. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

812 resin (Polysciences Inc., USA) and polymerized at 60 °C for 48 h. Ultrathin sections were obtained on a RMC ultramicrotome, collected on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed and photographed by means of a Zeiss 900 Transmission Electron Microscope.

2.4. White-matter sparing

From serial cross-sections, one of every 5 slides (each slide contained 10 μm sections spaced 50 μm apart), rostrally and caudally from the epicenter of the lesion, was stained with LFB over a total 1.5 cm segment, at least 5 mice in each analyzed group were used for this quantification. The spared white matter was calculated as total cross-sectional area minus LFB non-stained area, and reported in square millimeters as a percentage of the total cross-sectional area. Quantification was performed using the JAVA software (Jandel Video Analysis Software, Jandel Scientific, USA).

2.5. Immunohistochemistry

We used antisera raised against glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:200, Sigma, USA) and counterstaining with DAPI nuclear label (1:2000, Sigma, USA). Immunohistochemistry slides were washed in 0.1 M phosphate buffer saline (pH 7.4) with X-100 Triton (0.3%, washing solution), three times. Soon after, they were washed in the previous solution, to which normal goat serum had been added (10% NGS), and then incubated overnight with the primary antibody. They were then rinsed in the washing solution, followed by incubation with the CY3 secondary antibody (1:1000, Sigma,

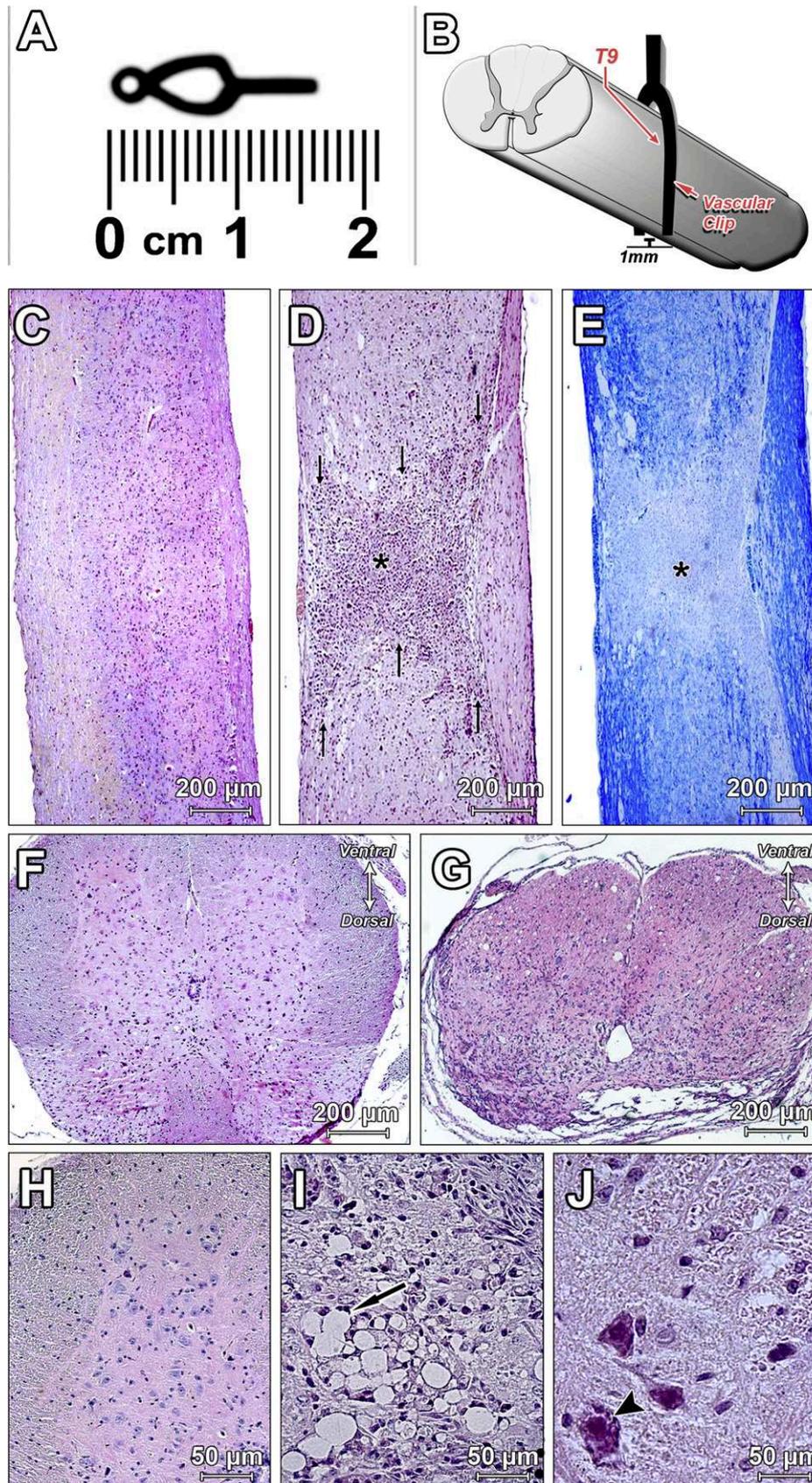
USA) for 2 h, and then rinsed in the same washing solution. After the reaction, DAPI nuclear label was applied for 10 min, washed, and the slides were mounted with n-propylgallate. Primary antibodies were omitted for negative controls. Sections were observed under a Zeiss Fluorescence Microscope (Axioscop 2 Plus), and images were acquired using the Axiovision program, version 4.5 (Zeiss).

2.6. Staining with the terminal deoxynucleotidyl transferase-uridine nucleotide end-labeling (TUNEL) technique

TUNEL labeling was performed according to the manufacturer's protocol (Chemicon, USA). The OCT-embedded sections were washed in phosphate buffer for 5 min, and then incubated with 20 μg/mL proteinase K (Chemicon, USA) for 15 min, after which endogenous peroxidase was quenched by incubation in 3% hydrogen peroxide in PBS for 5 min at room temperature. Equilibration buffer was applied for 1 min and then incubated overnight with TdT enzyme. After TUNEL staining, the sections were washed and counterstained with hematoxylin. Sections were observed under a Zeiss Microscope (Axioscop 2 Plus), and images were acquired using the Axiovision program, version 4.5 (Zeiss).

2.7. Statistical analysis

All data were analyzed in GraphPad Prism 4.0 (GraphPad software, USA) using a T test and Mann-Whitney test according to the data. Results are expressed as mean ± SD or median, minimum value and maximum value. P values ≤ 0.05 were considered significant.



3. Results

3.1. Functional analysis

3.1.1. Global mobility analysis

The Sham group showed no alteration in their locomotor behavior after laminectomy (Fig. 1A–D). They maintained a constant exploratory pattern, crossing the full length of the open field, and maintained the locomotor speed (15.80 ± 1.166 , mean \pm SD, Fig. 1I) during the assessment period. All animals of the SCI group showed paralysis and serious compromising of their movement after injury. At 1 day post-surgery, in this group, locomotor behavior was restricted to movement around its own axis (Fig. 1E). The locomotor speed increased progressively (5.581 ± 0.871 , mean \pm SD), during the experimental period, but did not reach normality. At 7 days after injury, restriction of the exploratory task still persisted in SCI mice (Fig. 1F). By 21–56 days after injury (Fig. 1G–H), SCI animals showed apparent stagnation of their spontaneous improvement, and they did not significantly improve in global mobility after that. From that time onward, muscle atrophy and structural deformities, such as scoliosis, were evident. The animals showed no further significant improvement during the remainder of the experimental period.

3.1.2. Open-field locomotion and BMS score

All mice used in this study showed a maximum BMS score (score 9) during assessment before the lesion. The Sham group showed no obvious deficits after recovery from anesthesia, and exhibited normal locomotion throughout the assessment period (BMS score 9). Immediately after SCI, all the SCI group showed flaccid paralysis with no hindlimb movement, and maintained this pattern at 1 day post-surgery (BMS score 0). The animals recovered a slight ankle movement during the first week post-injury, until day 10 (BMS score 1), and afterwards showed improvement until stepping. During the first 3 weeks, this group recovered extensive ankle movement (BMS score 2), and some animals reached dorsal stepping (BMS score 3). By 5–8 weeks after injury, they demonstrated frequent dorsal stepping (BMS score 3) or occasional plantar stepping (BMS score 4), but without any coordination. There were pronounced differences between the groups. The Sham group maintained the maximum BMS score (8.981 ± 0.056 , mean \pm SD) during the evaluation period, whereas some SCI animals only improved to the BMS intermediate phase (2.037 ± 1.198 , mean \pm SD), and there was no further functional improvement (Fig. 1J). Asymmetrical recovery was observed in SCI mice, with different scores between the left and right sides. Similar to the BMS investigators, we found distinct behaviors that indicated trunk instability, such as scoliosis, extensor or flexor spasm, and lateral displacement of the trunk with modification in the positioning of the paws during stepping. Sustained contractions in the hind-paws, similar to tetany, were widely seen in SCI animals that had stopped stepping on both hindlimbs, and reduced the locomotor performance of the animal.

3.1.3. Footprint test

We inked the paws to compare the stepping patterns of the Sham group versus the SCI group. Before injury, all animals showed normal coordination between the fore- and hindlimbs. The Sham group

maintained a normal step pattern print, but in the SCI group it was impossible to detect plantar paw impressions by the last period of observation (Fig. 1K). Occasionally, a slight blue impression was seen because of toe dragging (data not shown), but never a perfect plantar impression.

3.1.4. Light microscopy

Fig. 2A and B shows a photograph of the vascular clip used to cause the injury (A) and a schematic view of the clip at the spinal cord injury site (B). Spinal cord from the Sham group showed normal macroscopic and microscopic cytoarchitecture. There was a clear delimitation between white and gray matter, and normal cellularity (Fig. 2C, F and H). In the SCI group, widespread damage to the spinal cord was clearly visible in longitudinal sections taken through the epicenter of the lesion. Immediately after SCI it was possible to identify areas of hemorrhage in the epicenter of the lesion, which increased the volume of the spinal cord but did not damage the dura mater (data not shown). Also, it was difficult to discern limits between the white and gray matter in the epicenter of the lesion, and the tissue around it showed histological alterations. At 7 days after injury, high cell density, edema and cavitations were more evident, and these alterations were still present 56 days after injury (Figs. 2–4). These alterations were present in both white and gray matter areas. Small cavities were surrounded by groups of small cells (Fig. 2I). These small cavities resemble the cysts found in other SCI animal models (Ma et al., 2001; Camand et al., 2004). At 56 days after injury, motor-neuron degeneration and widespread demyelination were more evident (Figs. 2 and 3). Longitudinal sections showed structural disorganization in the epicenter of the lesion, with evident glial scar and widespread demyelination of the ascending and descending tracts (Fig. 2D and E). Cross-sections showed predominant demyelination in dorsal and lateral white-matter areas, but small cavities were evident in all white-matter regions (Fig. 3B–E).

3.1.5. White-matter sparing

Quantification of the spared white matter showed a loss of LFB stained areas in the SCI group ($p < 0.001$), as shown in Fig. 3D. White matter was described in terms of the percentage of spared white matter in the injured area. The Sham group showed normal structural distribution (Fig. 3A), whereas the SCI group showed an altered distribution with clear cavitation in the acute phase of the injury (Fig. 3B and E), and demyelination in the chronic phase (Fig. 3C). In the chronic phase it was also possible to see loss of motor neurons in the anterior horn (Fig. 3F).

3.1.6. Immunostaining

The Sham group showed normal cellularity in DAPI stained sections, whereas the SCI group showed increased cellularity. This increase was probably because of astrogliosis, as shown by GFAP labeling (Fig. 4A–D). Death of cells was assessed by TUNEL positive cells. The Sham group did not show any positive cells in the laminectomy area, whereas the SCI group showed many positive cells at the epicenter of the injury, Fig. 4E and F).

3.1.7. Semithin and ultrathin sections

Semithin sections of the SCI group showed nerve fibers organized in fascicles with glia cells around them (Fig. 5A). Preserved

Fig. 2. Histological analyses. (A) Vascular clip view. (B) Scheme of spinal cord compression at T9 level. (C–E) Longitudinal sections of spinal cord stained with HE (C, D) and KB (E). (C) Sham group at 56 days after surgery. (D) SCI group at 56 days after injury, showing increased cellularity (glial scar, delimited by arrows) in the area of the lesion. (E) SCI group at 56 days after injury, showing demyelination areas. (F–J) Transverse sections at T9 from the Sham group (F and H) and the SCI group (G, I and J). At 56 days after surgery, Sham group showed a normal organization while in the SCI group was difficult to see the difference between white and gray matter (G). In acute phase, cavitations surrounded by small cells (arrows) were more evident (I) while at 56 days after injury neuron damage was more evident (J, arrowheads). (D and E) Asterisks at injury area.

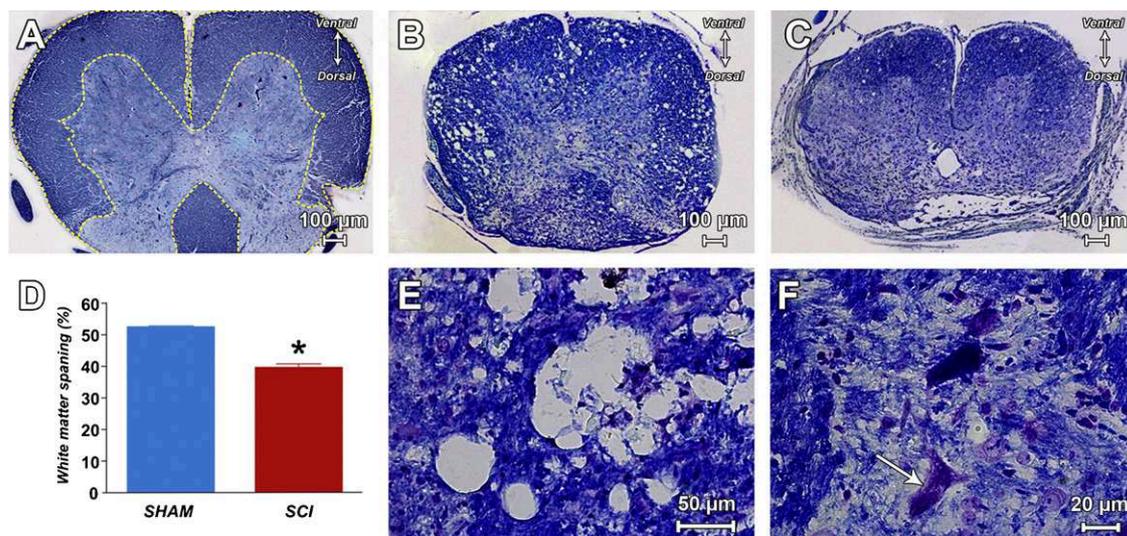


Fig. 3. White-matter sparing. Cross-sections stained with Klüver-Barrera (A–C, E and F). Sham group cross-section showed normal white matter distribution (A, dark-blue area between dotted lines illustrates the white-matter area that was quantified). SCI group, 7 days after injury (B and E) showed small cavitations predominantly in the white-matter area, while at 56 days, demyelination (C) and neuron death (F, arrow) were more evident. Observe the thickness of the meninges (C). Graph bars (D) show the morphometry results from LFB-stained sections. The amount of spared white matter revealed significant differences between the groups ($p < 0.001$).

fibers were also seen throughout the experimental period, in both the acute and chronic phases (Fig. 5B and C, respectively). We observed thickening of the meninges (Fig. 5C), mainly in dorsal areas, and the pia mater contained blood vessels with wider calibers (Fig. 5C). At 7 days after injury, an area of edema and small cavities were evident (Fig. 5D). At 56 days, there was clear angiogenesis (number and caliber of the vessels, Fig. 5E) in both the white and gray matter areas. In our study, none of the animals showed a single cavity formation after SCI, but rather multiple small cavities.

In the acute phase, ultrathin sections allowed us to observe astrocytic cells with phagocytic function, helping in the removal of the myelin and axon debris (Fig. 6A). Spared fibers were observed among degenerating fibers (Fig. 6B). In some areas, we could also observe the presence of ruptured blood vessels, and probably blood released to the extracellular space. This hemorrhage area was visible as an empty cavity enclosed by the blood vessel (Fig. 6B). We detected fibroblast invasion in the epicenter of the lesion during the acute phase of the injury. This was represented by the presence of the collagen fibers filling the cavities formed by this cell (Fig. 6C). At 56 days after injury, ultrastructural study revealed an astrocyte process around the small cavities (Fig. 6D) previously described. At this time it was still possible to see demyelination and remyelination. We observed central axon myelination by both oligodendrocytes (Fig. 7A) and Schwann cells (Fig. 7B) from the peripheral nervous system, which invaded the epicenter of the lesion.

4. Discussion

The main objective of spinal cord injury research is to better understand the primary and secondary events, in order to devise strategies to repair the damage or to minimize injury. In this study, we describe a simple and inexpensive method of producing an experimental compressive model of spinal cord injury, in mice, by means of a vascular clip. This model of spinal cord compression injury causes a standardized injury, as well as efficient and reproducible functional and morphological outcome measurements.

There is at present no simple or well-defined procedure available for complete characterization of the severity of a SC injury. One experimental procedure is contusion of the SC (Kwon et al., 2002; Basso, 2004; Rosenzweig and McDonald, 2004), which mimics the

situation in humans. However, with this approach it is not possible to interrupt specific and well-defined spinal tracts, in the manner that can be achieved by sectioning at specific locations. Other less clinically relevant models consist of transection or hemisection (Basso et al., 1996). Transection offers the distinct advantage of consistent reproducibility. Hemisection offers the ability to compare cellular responses ipsi- and contralateral to the injury. An extensive review of experimental studies postulates that permanent paraplegia induced in rats represents an appropriate experimental model. Therefore, each lesion mimics a particular aspect of the damage of the spinal cord that occurs in humans. It would be a considerable advantage for devising new strategies for helping patients if one could find a method for producing spinal cord injury in animals which could enable the effects to be evaluated in terms of the residual motor and sensory function.

Several investigators have used a clip to produce spinal cord injury in rats (Rivlin and Tator, 1978; Fehlings and Tator, 1995; von Euler et al., 1997), and in mice (Joshi and Fehlings, 2002a,b; Faulkner et al., 2004). These models produced consistent injury at different spinal cord levels, such as cervical (Casha et al., 2001), thoracic (Poon et al., 2007) or lumbar (Park and Tator, 1998). The clip impact-compression model has been used by different groups to examine events of SCI degeneration and regeneration (Nashimi and Fehlings, 2001; Weaver et al., 2001; Faulkner et al., 2004; Karimi-Abdolrezaee et al., 2006; Saadoun et al., 2008).

Rivlin and Tator (1978) described the first animal compression-injury model for standardized acute traumatic spinal cord injuries. In their model, the rat spinal cord was exposed by laminectomy, and extradural compression was performed using a Kerr-Lougheed aneurysm clip (Rivlin and Tator, 1978). This clip exerts force on the spinal cord bidirectionally and simultaneously from the ventral and dorsal surfaces, when the blades are closed in the anteroposterior plane. It simulates the common mechanisms of injuries in human SCI such as fracture-dislocation and burst-compression fractures (Dolan and Tator, 1979; Poon et al., 2007). The vascular clip that we used is closed around the spinal cord in the vertical plane, and therefore exerts force from side to side on the spinal cord. Despite the differences in the way that the clip is closed around the spinal cord, our functional and morphological results are compatible with those described in the literature for clips that close in the

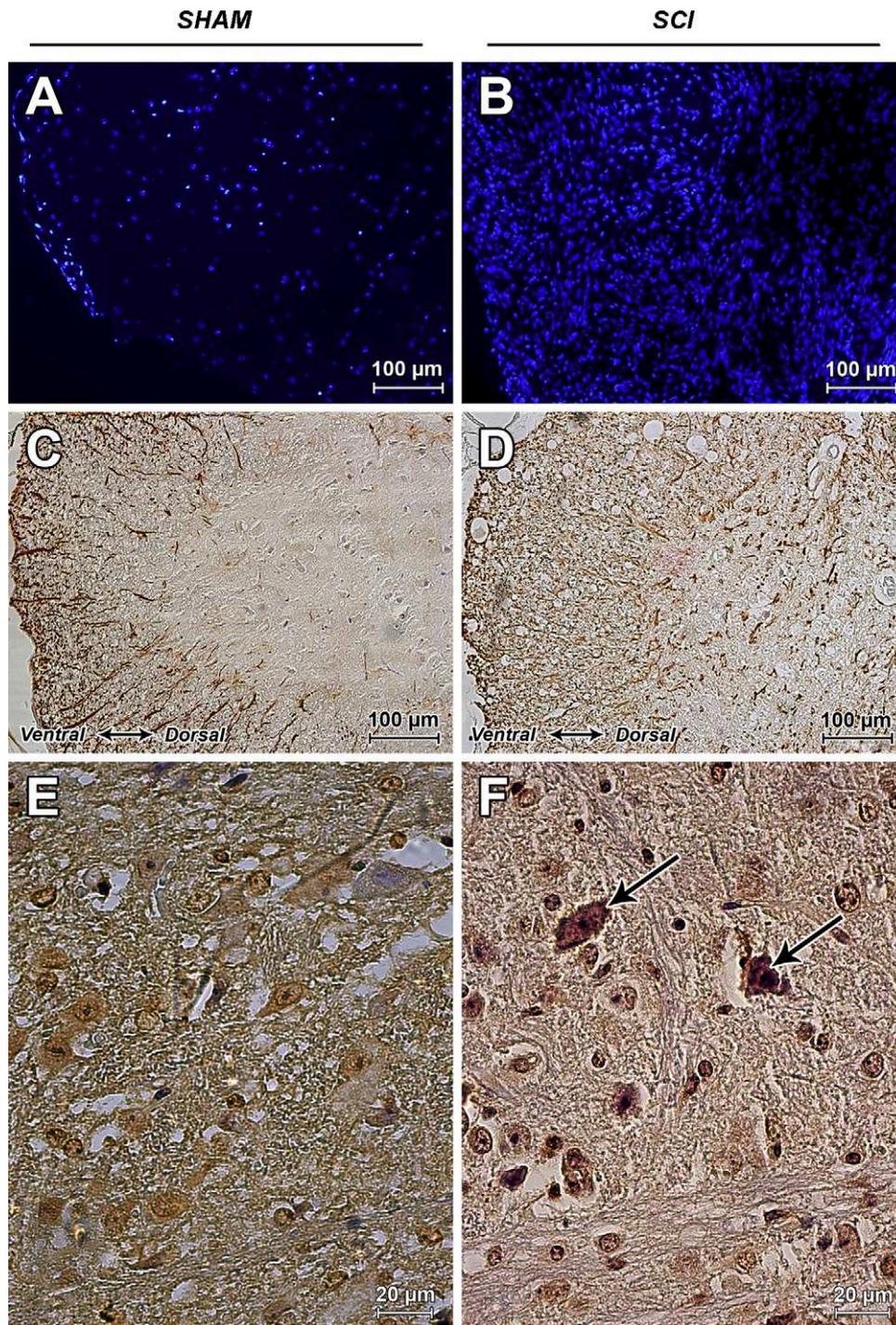


Fig. 4. Staining with DAPI (A and B), GFAP (C and D) and TUNEL (E and F). In DAPI stained sections we observed a higher cellularity when compared the Sham group (A) with the SCI group (B), probably because of increased astrogliosis as observed in C and D. Cell death by apoptosis (arrows) was detected by TUNEL staining (E and F) in the epicenter of the lesion.

anteroposterior plane (Khan and Griebel, 1983; Poon et al., 2007). Clip closing in the vertical plane was also used by von Euler et al. (1997). In their study, they used a Bulldog type clip to produce compressive SCI in rats, and their results were similar to those described for the anteroposterior blades clip. Our results are similar to those described in von Euler's studies, and can therefore be applied to mice.

Several investigators have described histological data after compression injury (Dolan et al., 1980; Khan and Griebel, 1983; Faulkner

et al., 2004), and our results were very similar to theirs. The clip SCI model produces histopathological changes that are very similar to human SCI, due to a combination of contusion and compression injuries (Dolan and Tator, 1979). In our mouse experimental model, the primary injury also includes elements of contusion and compression. Contusion is caused by the clip blades impacting on the spinal cord tissue at the beginning of the closing phase. The compression mechanism between the closed blades is obvious. Contusion causes immediate mechanical injury with disruption of

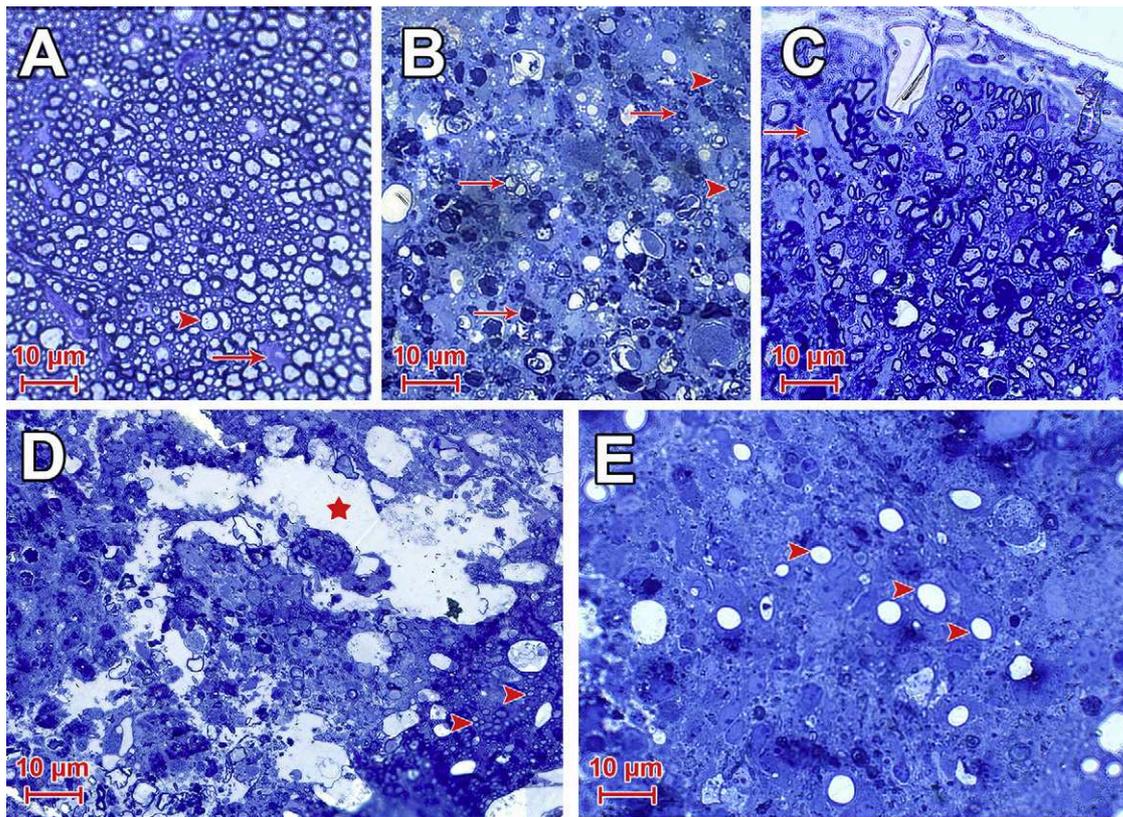


Fig. 5. Semithin cross-sections stained with Toluidine blue. Normal fiber organization (arrowheads) and glial cells surrounding them (arrows) in the Sham group (A). The SCI group at 7 days after injury (B and D) showing axon degeneration (arrows), areas of edema (red star) and areas of spared fibers (arrowheads). At 56 days after SCI (C and E), the fibers were more organized, but there was clear gliosis (C, arrow) and evident angiogenesis (E, arrowheads).

structure and hemorrhage, and compression produces temporary tissue displacement and ischemia. This injury mechanism closely simulates the human clinical situation of a patient during a spinal trauma, in which vertebral fragments are vigorously propelled into the spinal canal (contusion), consequently leading to compression of the spinal cord. The extent of the secondary injury, both in human SCI and in our animal model, is determined by several factors, such as the force of injury, the timing of ischemia and reperfusion due to the duration of compression, and by the ability of the organism to repair the injury. While the exact force or duration of the traumatic impact on the spinal cord is rarely known in human SCI, these parameters are relatively well controlled in our animal model.

Animals injured with the clip compression model are completely paraplegic after clip application. Below the level of the injury, the limbs are flaccid, and no withdrawal response is elicited by pinching the paws. There is no spontaneous micturition, and bladders need to be manually expressed three times daily until bladder function is recovered (Joshi and Fehlings, 2002a,b). Our injured mice showed similar functional performance after compression by the vessel clip. Morphological results also agree with most histopathological data described in human SCI (Kakulas, 1984). According to Khan and Griebel (1983), the injuries generated with the clip compression model were found to be much more consistent with respect to clinical recovery than were injuries produced by the weight-drop method. Therefore, our compressive model seems to be appropriate for therapeutic experimentation and regeneration analysis.

Another advantage of the clip model is that the severity of the injury can be varied intentionally through changes in two variables, the clip force or the duration of clip-closure around the

spinal cord (Dolan and Tator, 1979). These changes will produce injuries with different levels of severity (Dolan et al., 1980). Also, this model is simple and easily reproducible in small rodents (Dolan et al., 1980). Based on previous studies (Dolan et al., 1980; Joshi and Fehlings, 2002a,b; Karimi-Abdolrezaee et al., 2006; Poon et al., 2007), we chose to compress the spinal cord for 1 min, and our results showed that this length of time was sufficient to cause moderate to severe damage to the spinal cord, which resulted in paraplegia.

Our morphological results indicate that this is an adequate model in terms of producing a moderate to severe spinal cord injury. After the compression, we observed a large area of hemorrhage and tissue edema, which has been described by many other investigators as the initial traumatic response (Saadoun et al., 2008). Electron microscopy analysis allowed us to detect the presence of ruptured vessels surrounded by areas of edema, which probably results from blood flow out of the vessel lumen to the extracellular space. Initial traumatic injury has been described as mechanical damage that causes tract rupture and cell death (neurons, oligodendrocytes and endothelial cells). In our model, there was loss of neurons and the presence of TUNEL-positive cells in the epicenter of the lesion. Large areas of demyelination were also seen after injury, which might result from either oligodendrocyte cell death or myelin breakdown following Wallerian degeneration.

Electron-microscopy observation of the injured tissue revealed the presence of small cavities in the parenchyma of the spinal cord. These cavities were surrounded by hypertrophic astrocytic processes filled with bundles of intermediate filaments, similar to what has been described in rats, in which only one large cavity is formed (Reier, 2004). As far as we know, this is the first report on the ultrastructure of the small cavities observed in mice after spinal cord

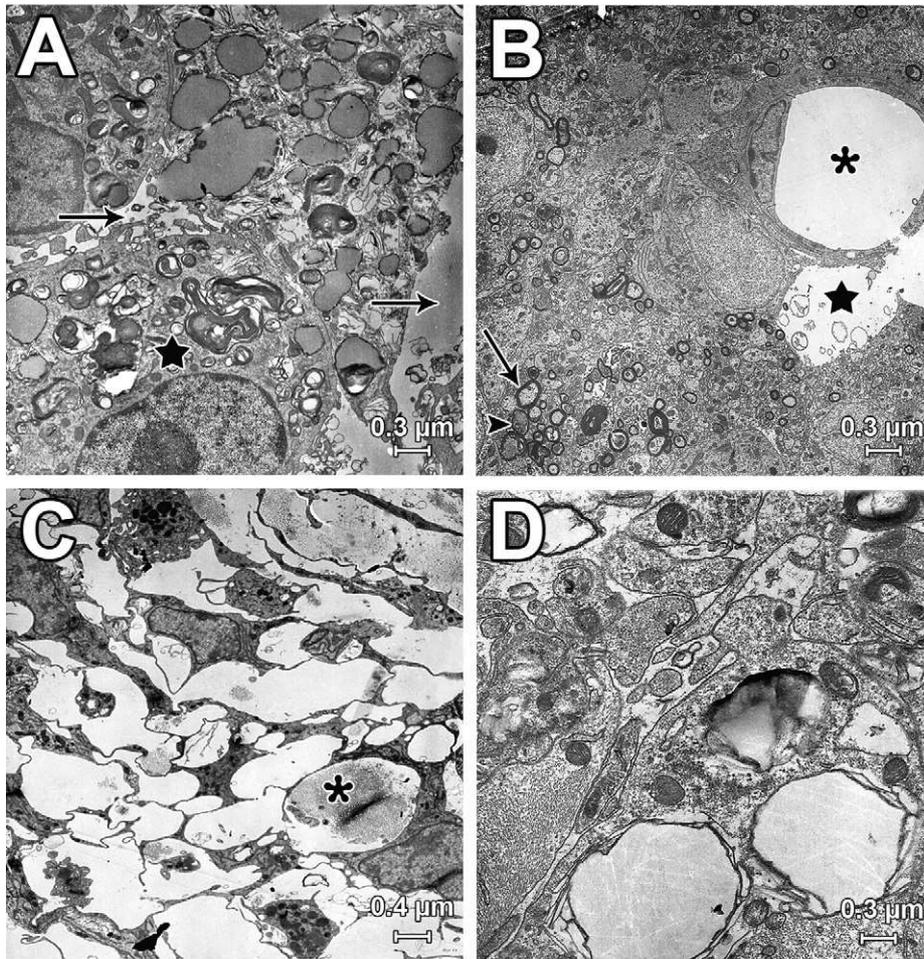


Fig. 6. Ultrastructural analysis at 7 days (A, B and C) and 56 days after injury (D). (A) Phagocytic function by astrocyte cells (white star) and edema (arrows), which increased the inter-cell space. (B) Spared fibers (arrow) next to degenerating cells (arrowheads). Ruptured large-caliber vessel (asterisk) with edema area around it (white star). (C) Fibroblast invasion at the epicenter of the lesion, showing cavities filled by collagen (asterisk). (D) Micro cavities surrounded by astrocytic process.

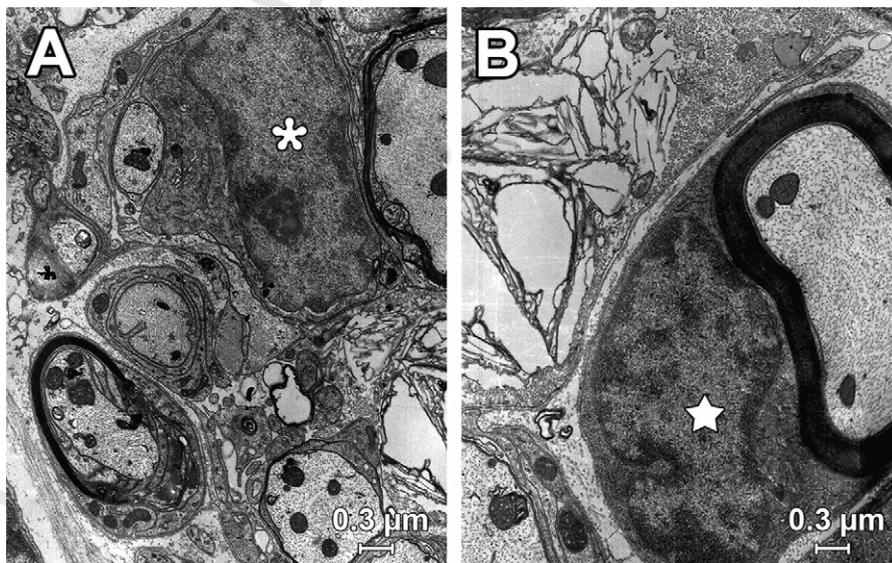


Fig. 7. Electron microscopy at 56 days after SCI. Axons being myelinated by oligodendrocyte (A, asterisk) and by Schwann cells (B, white star).

trauma. Although we confirmed the participation of the astrocytes around the cavities in mice, the reason why these animals differ in the number of cavities is still unclear.

Quantitative analyses of our data showed loss of white matter in SCI animals, and this finding correlated adequately with functional loss. White-matter sparing is commonly used in SCI research to assess the severity of injury, because it correlates properly with locomotor function (Bresnahan et al., 1991; Ma et al., 2001; Scheff et al., 2003; Basso et al., 2006; Poon et al., 2007). In accordance with other researchers, we detected significant correlation between white-matter sparing and locomotor function. SCI animals showed a spontaneous, though limited, functional improvement after injury. However, this improvement appeared to reach a plateau at 4 weeks. Other authors have also reported this spontaneous improvement and tendency to plateau at about 4 weeks after injury, independently of the experimental injury model used (von Euler et al., 1997; Scheff et al., 2003; Basso et al., 2006). After that time, we observed atrophy and deformities, probably due to persistent immobility after injury. The degree of white-matter sparing is probably responsible for better functional recovery. In our study, we detected evidence of myelination of spared axons, by both oligodendrocytes and Schwann cells. This is probably related to the spontaneous recovery response. Another possible explanation for the spontaneous recovery after SCI is the increase of excitability of central pattern (CPG) neurons, which can promote locomotor movements (Lapointe et al., 2007). CPG neurons are located in lumbar segments (L1-L2 in mice, Nishimaru and Kudo, 2000), which in general correspond to sublesional spinal cord areas, where it has been shown to occur up- or down-regulation of the expression of immediate early genes (IEG), such as *c-fos* and *nor-1*, neurotrophic factors and others. It is known that IEG have a role on CNS development and plasticity, and therefore, they might be responsible for the increased excitability of CPG neurons after SCI (see discussion in Lapointe et al., 2007).

Most studies on functional behavior after SCI are usually based on a subjectively scored locomotor test, such as BBB and BMS (Coutts and Keirstead, 2008). Our functional tests included the Basso mouse scale as the majority, but also introduced a new **non-subjective** test, which we called global mobility test, based on the animal's ability to freely walk around the open field. This type of evaluation has the advantage of providing a quantitative and **non-subjective** analysis of the locomotor outcome, which can be complementary to the BMS and, most important, can be performed by a **non-trained** investigator.

In conclusion, we describe here a simple and reliable method of inducing SCI in mice, which can be applied in future experimental studies dealing with therapeutic strategies.

Acknowledgements

The authors are grateful to Klauss Mostacada, Jorge Luis da Silva (LNR-UFRJ) and Celia A da-Silva (FORP-USP) for technical assistance. This study was supported by CNPq, CAPES and FAPERJ.

References

- Bareyre FM, Schwab ME. Inflammation, degeneration, and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci* 2005;23(10):555-63.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Histological and motor studies of graded spinal cord contusion injury using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 1996;139:224-56.
- Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, Mctigue DM, Popovich PG. Basso mouse scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma* 2006;23(5):635-59.
- Basso DM. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *J Neurotrauma* 2004;21(4):395-404.

- Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma* 1992;9:197-217.
- Bresnahan JC, Beattie MS, Stokes BT, Conway KM. Three-dimensional computer-assisted analysis of graded contusion lesions in the spinal cord of the rat. *J Neurotrauma* 1991;8:91-101.
- Bresnahan JC, Beattie MS, Todd III FD, Noyes DH. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impact device. *Exp Neurol* 1987;95:548-70.
- Camand E, Morel M-P, Faissner A, Sotelo C, Dusart I. Long-term changes in the molecular composition of the glial scar: progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *Eur J Neurosci* 2004;20:1161-76.
- Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with Fas and P75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 2001;103:203-18.
- Coutts M, Keirstead HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol* 2008;209:368-77.
- Dolan EJ, Tator CH, Enderny L. The value of decompression for acute experimental spinal cord compression injury. *Neurosurg* 1980;53:749-55.
- Dolan EJ, Tator CH. A new method for testing the force of clips for aneurysms of experimental spinal cord compression. *J Neurosurg* 1979;51:229-33.
- Faulkner JR, Hermann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 2004;24:2134-55.
- Fehlings MG, Tator CH. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1995;132:220-8.
- Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* 1992;9(2):123-6.
- Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006;23(3/4):264-80.
- Hayes KC, Kakulas BA. Neuropathology after human spinal cord injury sustained in sports-related activities. *J Neurotrauma* 1997;14(4):235-48.
- Joshi M, Fehlings MG. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse. Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J Neurotrauma* 2002a;19:175-90.
- Joshi M, Fehlings MG. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse. Part 2. Quantitative neuroanatomical assessment and analysis of the relationships between axonal tracts, residual tissue, and locomotor recovery. *J Neurotrauma* 2002b;19:191-203.
- Kakulas BA. Pathology of spinal cord injuries. *Central Nerv Sys Trauma* 1984;1:117-29.
- Kamencic H, Griebel RW, Lyon A, Paterson AG, Juurlink BHJ. Promoting glutathione synthesis following spinal cord trauma decreases secondary damage and promotes retention of function. *FASEB J* 2001;15:243-50.
- Karimi-Abdolrezaee S, Eftekharpour E, Wang J, Morshead CM, Fehlings MG. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 2006;26(13):3377-89.
- Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 2005;25(19):4694-705.
- Khan M, Griebel R. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can J Neurol Sci* 1983;10:161-5.
- Kluver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1953;12:400-3.
- Kunkel-Bagden E, Dai H-N, Bregman BS. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 1993;119:153-64.
- Kwon BK, Oxlund TR, Tetzlaff W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine* 2002;27(14):1504-10.
- Lapointe NP, Ung R-V, Guertin PA. Plasticity in sublesional located neurons following spinal cord injury. *J Neurophysiol* 2007;98:2497-500.
- Ma M, Basso DM, Walters P, Stokes BT, Jakeman LB. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57Bl/6 mouse. *Exp Neurol* 2001;169:239-54.
- Nashimi R, Fehlings MG. Changes in axonal physiology and morphology after chronic compressive injury of the rat thoracic spinal cord. *Neuroscience* 2001;104:235-51.
- Nishimaru H, Kudo N. Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse. *Brain Res Bull* 2000;53:661-9.
- Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma* 2004;21:754-74.
- Park YK, Tator CH. Prevention of arachnoiditis and postoperative tethering of the spinal cord with Gore-Tex surgical membrane: an experimental study with rats. *Neurosurgery* 1998;42:813-23.
- Poon PC, Gupta D, Shoichet MS, Tator CH. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries. *Spine* 2007;32(25):2853-9.
- Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC, Wuermser J-A, HO CH. Spinal cord injury medicine. 6. Economic and societal issues in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2007;88(Suppl. 1):s64-8.

- 641 Reier PJ. Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and trans- 655
642 lational neurobiology. *J Am Soc Exp NeuroTherapeutics* 2004;1:424– 656
643 51. 657
- 644 Rivlin AS, Tator CH. Effects of duration of acute spinal cord compression in 658
645 a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol* 1978;10(1):38– 659
646 43. 660
- 647 Rosenzweig ES, McDonald JW. Rodent models for treatment of spinal cord 661
648 injury: research trends and progress toward useful repair. *Curr Opin Neurol* 662
649 2004;17:121–31. 663
- 650 Q4 Saadoun S, Bell BA, Verkman AS, Papadopoulos MC. Greatly improved neurological 664
651 outcome after spinal cord compression injury in AQP4-deficient mice. *Brain* 665
652 2008;131:1087–98. 666
- 653 Scheff SW, Rabchevsky AG, Fugaccia I, Main JA, Lumpp Jr JE. Experimental mod- 667
654 eling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J* 668
Neurotrauma 2003;20:179–93. 669
- Schwab JM, Brechtel K, Mueller CA, Failli V, Kaps HP, Tuli SK, et al. Experimental 655
strategies to promote spinal cord regeneration—an integrative perspective. *Prog* 656
Neurobiol 2006;78:91–116. 657
- Sekhon LHS, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of 658
acute spinal cord injury. *Spine* 2001;26(24S):s2–12. 659
- Shih R, Pryor JD. Pathological changes of isolated spinal cord axons in response to 660
mechanical stretch. *Neuroscience* 2002;110:765–77. 661
- von Euler M, Seiger A, Sundstrom E. Clip compression injury in the spinal cord: 662
a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp Neurol* 663
1997;145:502–10. 664
- Weaver LC, Verghese P, Bruce JC, Fehlings MG, Krenz NR, Marsh DR. Autonomic 665
dysreflexia and primary afferent sprouting after clip-compression injury of the 666
rat spinal cord. *J Neurotrauma* 2001;18:1107–19. 667
- Zheng B, Lee JK, Xie F. Genetic mouse models for studying of spinal axon regeneration. 668
Trends Neurosci 2006;29:640–6. 669

UNCORRECTED PROOF

9.2 Apêndice B

Journal of Neurotrauma

Journal of Neurotrauma: <http://mc.manuscriptcentral.com/neurotrauma>

EMBRYONIC STEM CELLS PROMOTE FUNCTIONAL RECOVERY AFTER SPINAL-CORD COMPRESSIVE INJURY

Journal:	<i>Journal of Neurotrauma</i>
Manuscript ID:	NEU-2008-0808
Manuscript Type:	Regular Manuscript
Date Submitted by the Author:	20-Oct-2008
Complete List of Authors:	Martinez, Ana Maria Blanco; UFRJ, Histology Marques, Suelen; Federal University of Rio de Janeiro, Histology Rehen, Stevens; Federal University of Rio de Janeiro, Anatomy Fernandes, Aline; Federal University of Rio de Janeiro, Anatomy
Keywords:	TRAUMATIC SPINAL CORD INJURY, IN VIVO STUDIES, REGENERATION, STEM CELLS, THERAPEUTIC APPROACHES FOR THE TREATMENT OF CNS INJURY



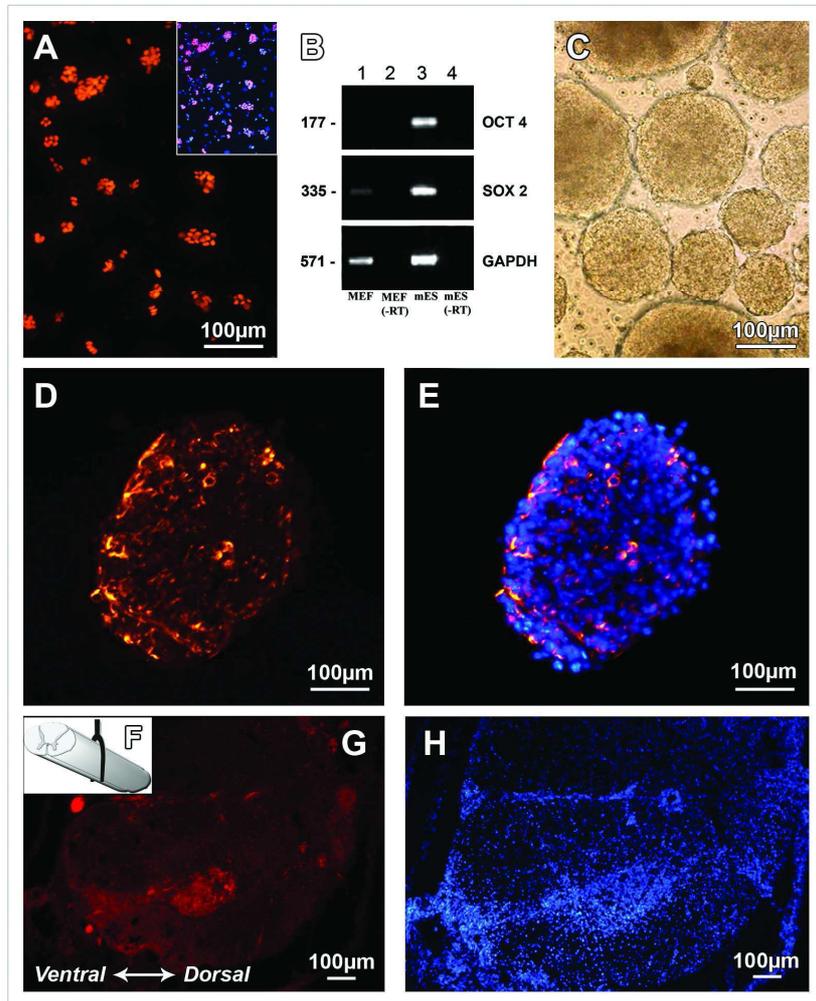


Figure 1:

140x199mm (300 x 300 DPI)

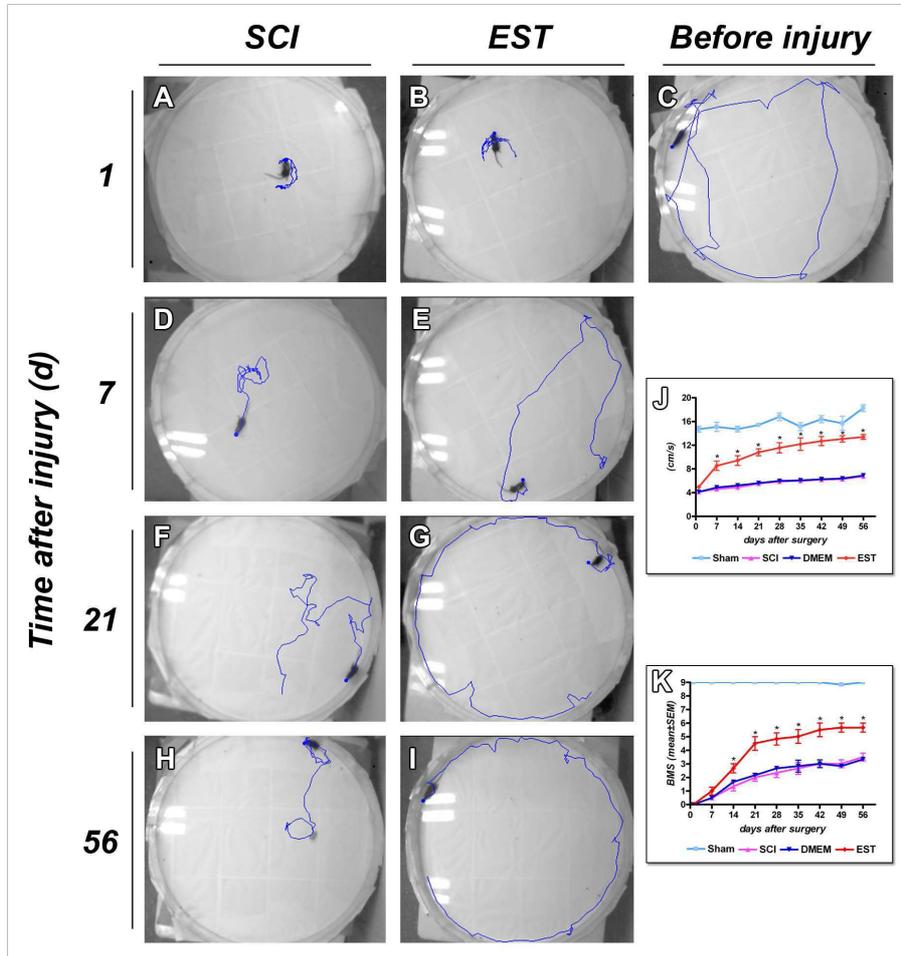


Figure 2 -

162x209mm (300 x 300 DPI)

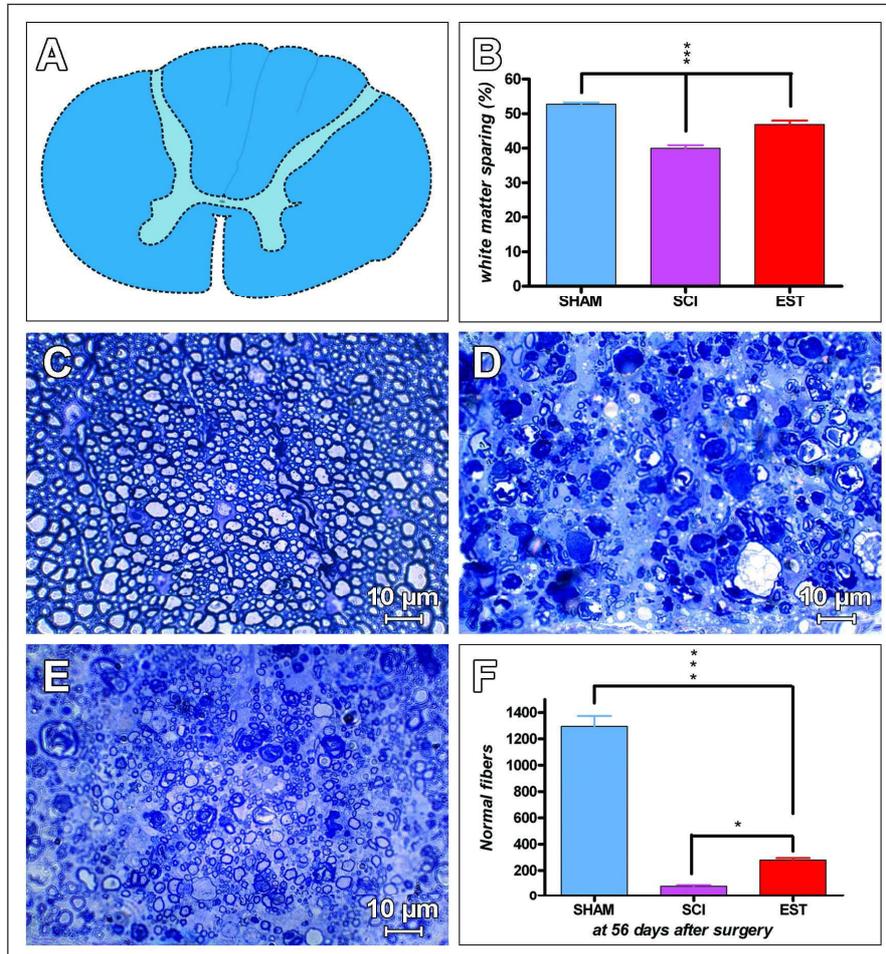


Figure 3 -

150x199mm (300 x 300 DPI)

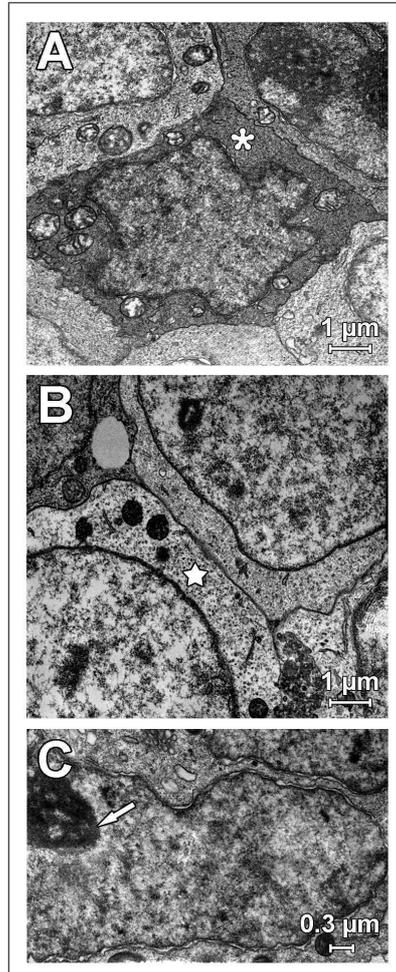


Figure 4 -

67x199mm (300 x 300 DPI)

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

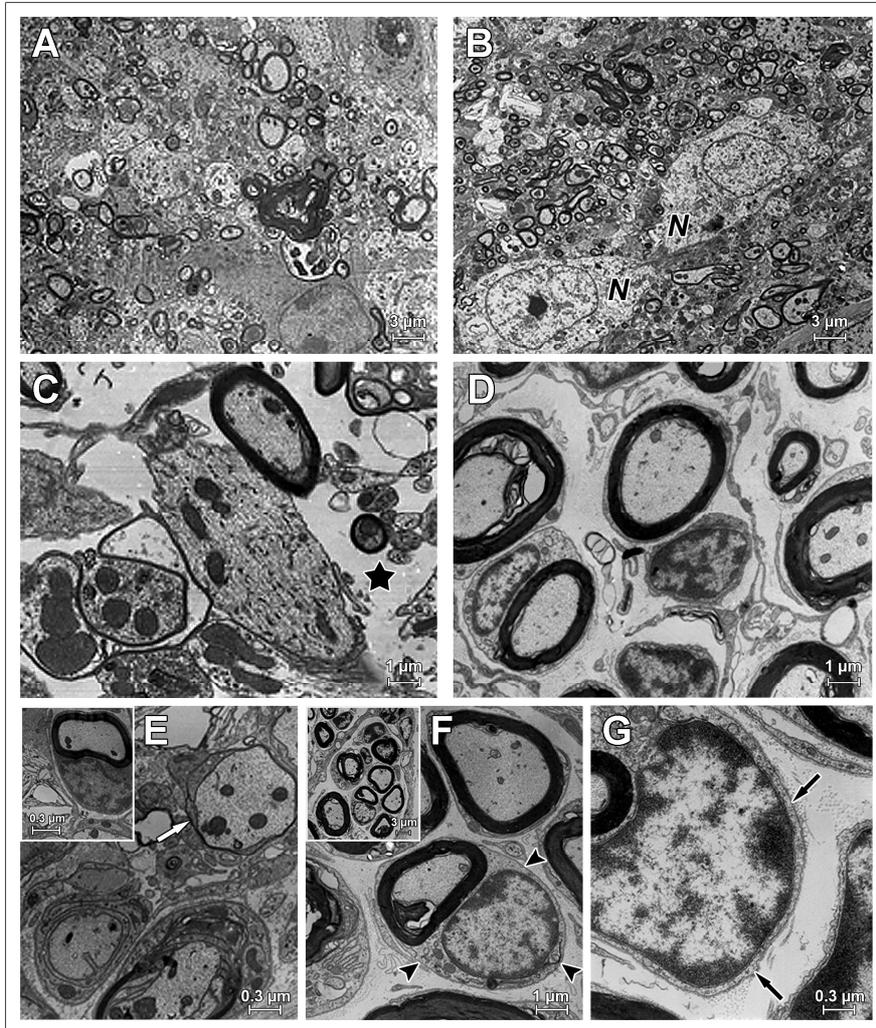


Figure 5 -

191x260mm (300 x 300 DPI)

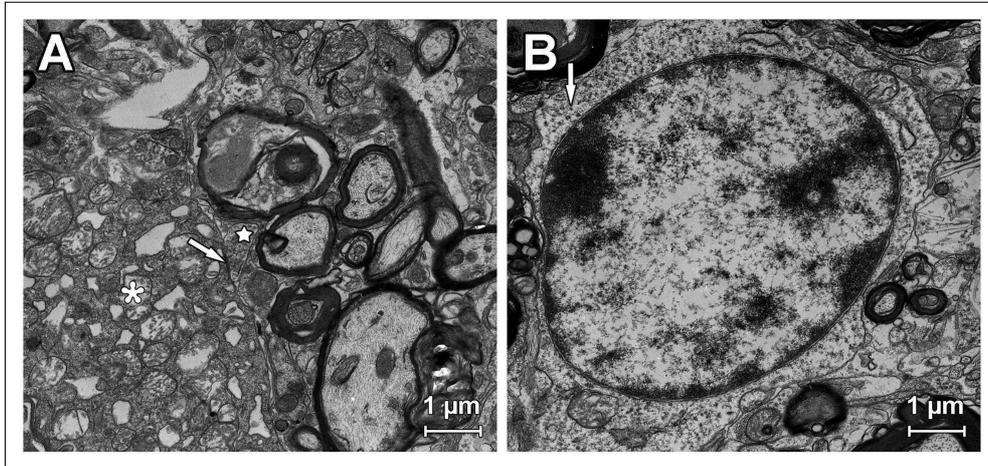


Figure 6 -

169x109mm (300 x 300 DPI)

Review

1
2
3
4 **EMBRYONIC STEM CELLS PROMOTE FUNCTIONAL RECOVERY AFTER**
5
6 **SPINAL-CORD COMPRESSIVE INJURY**
7
8
9

10
11 **Suelen Adriani Marques¹, Aline Fernandes², Stevens Kastrup Rehen² and Ana**
12
13 **Maria Blanco Martinez¹**
14
15

16
17
18 **Laboratório de Neurodegeneração e Reparo¹, Laboratório de Neurogênese e**
19 **Diferenciação Celular², Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da**
20 **Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil**
21
22
23
24
25

26
27
28 **Addresses:**
29

30 **Suelen Adriani Marques, PhD**
31

32 **Federal University of Rio de Janeiro,**
33

34 **Av. Rodolfo Paulo Rocco, 255 – Centro de Ciências da Saúde – Laboratório de**
35

36 **Neurodegeneração e Reparo, F012 - Cidade Universitária – Ilha do Fundão –**
37

38 **Instituto de Ciências Biomédicas, 21941-913 – Rio de Janeiro – RJ – Brazil**
39

40 **Phone / Fax: +55 (021) 25626431/ +55 (021) 25626480**
41

42 **e-mail : suelen_marques@ yahoo.com**
43
44
45

46
47
48
49 **Aline M Fernandes, MsC**
50

51 **Federal University of Rio de Janeiro, PhD student**
52

53 **Av. Rodolfo Paulo Rocco, 255 – Centro de Ciências da Saúde – Laboratório de**
54

55 **Neurogênese e Diferenciação Celular - Cidade Universitária – Ilha do Fundão –**
56

57 **Instituto de Ciências Biomédicas, 21941-913 – Rio de Janeiro – RJ – Brazil**
58
59
60

1
2
3
4 **Phone / Fax: +55 (021) 25626460/ +55 (021) 25626480**

5
6
7 **e-mail : ne_marie@hotmail.com**

8
9
10
11 **Stevens K Rehen, PhD**

12
13 **Federal University of Rio de Janeiro, Assistant Professor**

14
15
16 **Av. Rodolfo Paulo Rocco, 255 – Centro de Ciências da Saúde – Laboratório de**

17
18 **Neurogênese e Diferenciação Celular - Cidade Universitária – Ilha do Fundão –**

19
20 **Instituto de Ciências Biomédicas, 21941-913 – Rio de Janeiro – RJ – Brazil**

21
22 **Phone / Fax: +55 (021) 25626460/ +55 (021) 25626480**

23
24
25 **e-mail : srehen@anato.ufrj.br**

26
27
28
29
30 **Corresponding author:**

31
32
33 **Dr. Ana Maria Blanco Martinez, MD, PhD**

34
35 **Federal University of Rio de Janeiro, Associate Professor**

36
37 **Av. Rodolfo Paulo Rocco, 255 – Centro de Ciências da Saúde – Laboratório de**

38
39 **Neurodegeneração e Reparo, F2-12 - Cidade Universitária – Ilha do Fundão –**

40
41 **Instituto de Ciências Biomédicas, 21941-913 – Rio de Janeiro – RJ – Brazil**

42
43 **Phone / Fax: +55 (021) 25626431/ +55 (021) 25626480**

44
45
46 **e-mail: martinez@ histo.ufrj.br**

ABSTRACT

We tested the effects of grafts of mouse embryonic stem cells (ES) in mice spinal-cord injury (SCI). Young adult female C57/Bl6 mice were subjected to laminectomy at T9 and compression of the spinal cord with a vascular clip, for 1 minute. Four groups were analyzed: laminectomy (Sham), injured (SCI), vehicle (DMEM) and ES-treated (EST), each n=11. ES pre-differentiated with retinoic acid were injected (8×10^5 cells/ $2 \mu\text{l}$) into the epicenter of the lesion, 10 minutes after SCI. Behavioral assessment (BMS and global mobility) were tested weekly up to 8 weeks, when quantification of the spared white matter and number of myelinated fibers was performed, followed by statistical analyses using one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test. All injured animals showed flaccid paralysis of the hind limbs 24 h after injury. Global mobility analysis showed that EST animals moved faster (10.73 ± 0.9076 , $\pm\text{SEM}$) than SCI (5.581 ± 0.2905) and DMEM (5.705 ± 0.2848), but slower than Sham animals (15.80 ± 0.3887), $p < 0.001$. By BMS, EST animals reached the final phase of locomotor recovery (3.872 ± 0.7112), ($p < 0.01$) while animals of the SCI and DMEM groups improved to an intermediate phase (2.037 ± 0.3994 and 2.111 ± 0.3889 , respectively). White-matter area (46.80 ± 1.24 , $\pm\text{SEM}$) and number of myelinated nerve fibers (279.4 ± 16.33 , $\pm\text{SEM}$) were greater in the EST than the SCI group (39.97 ± 0.925 ; 81.39 ± 8.078 , respectively), $p < 0.05$. Ultrastructural analysis showed, in the EST group, better tissue preservation and more remyelination by oligodendrocytes and Schwann cells than the other groups. Our results indicate that acute transplantation of pre-differentiated ES into the injured spinal cord increased the spared white matter and number of nerve fibers, improving locomotor function. **Keywords (5): embryonic stem cell, spinal cord injury, functional regeneration, Basso mouse scale, global mobility.**

INTRODUCTION

Each year, several thousand individuals suffer spinal-cord injury (SCI) throughout the world. SCI results in a complete loss of motor, sensory and vegetative functions below the site of the injury. Despite the increased survival rate due to modern therapy methods, these patients still retain a handicap during their life (Schwab et al., 2006), and this has a significant impact on quality of life, life expectancy, and economic burden (Sekhon and Fehlings, 2001; Priebe et al., 2007).

SCI pathophysiology is a two-step process involving primary and secondary mechanisms. The primary events are related to mechanical deformation and energy deprivation, whereas the secondary events involve cascades of biological and cellular processes that are almost instantaneously triggered by the injury primary process (Sekhon and Fehlings, 2001). Pathophysiological mechanisms of secondary events include spinal cord ischemia, edema, free-radical damage, excitotoxicity, inflammatory injury, apoptosis, demyelination, and cell loss (Casha et al., 2001; McDonald and Sadowsky, 2002; Kwon et al., 2004; Schwab et al., 2006). These secondary events may exacerbate the initial damage, causing further destruction of neuronal and glial cells, which will result in additional neurological deficits.

There are many experimental approaches aiming to improve functional recovery after spinal-cord injury. These strategies include neuroprotection and regeneration through transplants of stem cells of several lineages, and injection of neurotrophic factors or antidegenerative drugs (Reier, 2004; Schwab et al., 2006). Cell-based approaches have

1
2
3
4 the most translational potential for spinal-cord functional repair, through two possible
5 mechanisms: restitution of white-matter long-tracts (to be referred to as “regenerative”
6 approaches) and cell replacement (i.e., neuronal or oligodendrocytes) (Reier, 2004).
7
8
9 Different cell types have been proposed to regenerate spinal-cord injuries in animal
10 models, including mesenchymal stem cells, Schwann cells, olfactory ensheathing cells,
11 adult-derived neural precursor cells, and embryonic stem cells (Au et al., 2007;
12 Biernaskie et al., 2007; Lim et al., 2007; Toft et al, 2007; Yan et al., 2007). Although
13 different cell types have been tested in SCI animal models, there is no consensus on
14 which is the best candidate, in terms of functional outcome, to be used in clinical human
15 trials
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 Embryonic stem cells (ES) are a population of pluripotent cells derived from the inner
31 cell mass of preimplantation embryos. These cells show two features: indefinite
32 capability of self-renewal, and the ability to differentiate into all cell types of an adult
33 organism (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000). When ES are cultivated on a
34 monolayer of murine embryonic fibroblasts (MEFs) they grow as undifferentiated
35 colonies that express specific pluripotent markers such as OCT-4 and SOX-2, both
36 transcriptional factors. If MEFs are removed, the ES begin to aggregate in a three-
37 dimensional structure termed embryoid bodies (EB), recreating embryo development
38 followed by spontaneous differentiation into the three germ layers (Zhou et al., 2005).
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
EB can be induced to differentiate into several cell types, such as neural progenitors
(Okada et al., 2004) and oligodendrocyte cells (Keirstead et al., 2005).

1
2
3
4 Here we tested the hypothesis that grafts of neural-progenitor pre-differentiated
5 embryonic stem cells could improve functional recovery after SCI in mice. For this, we
6 used a reliable experimental compressive model of SCI, which was established in our
7 laboratory (Marques et al., in press). This model of SCI simulates the clinical situation
8 observed in humans after SCI injury, and allows “in vivo” tests of cell therapeutic
9 approaches. Data were assessed by functional and morphological analyses. Our results
10 showed a better functional outcome in the ES-treated group, and this finding correlated
11 positively with a higher degree of myelination represented by larger areas of spared
12 white matter.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 **METHODOLOGY**

29
30
31
32
33 Our experimental work was approved by the Commission of Animal Care of the
34 “Centro de Ciências da Saúde – Protocol number DHEICB003. / Universidade Federal
35 do Rio de Janeiro.”
36
37
38

39
40 **Cell culture:** Murine embryonic stem cells (ES), which were kindly provided by Dr.
41 Lygia V. Pereira (University of São Paulo, Brazil) and Dr. Irina Kerkis (Butantan,
42 Brazil) were cultured on murine embryonic fibroblasts (MEFs, Hygeia Pesquisa e
43 Desenvolvimento em Biotecnologia Aplicada, Brazil), inactivated with mitomycin C
44 (10 µg/mL, Sigma-Aldrich Sweden AB) in DMEM/F12 supplemented with 15%
45 knockout serum replacement (KSR, Invitrogen) and 1,000 U/mL LIF (Chemicon) for 3
46 days. After this period, ES were dissociated with TrypLE™ (Invitrogen) and plated on
47 bacterial dishes in DMEM/F12 supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) with
48 LIF (named EB medium) for two days, until embryoid bodies (EB) were formed. EB
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 were treated with 2 μ M all trans-retinoic acid (RA, Sigma) for four days, with the
5
6 medium changed every other day (Okada et al., 2004). Prior to the transplantation
7
8 procedure, EB were enzymatically dissociated with TrypLE™ followed by labeling
9
10 with CellTracer. 8×10^5 cell/2 μ L were transplanted into the site of spinal-cord injury.
11
12 RA-induced differentiation was assessed by immunocytochemistry (nestin) in EB, fixed
13
14 with paraformaldehyde (PF, 4%) and sectioned (10 μ m) with a cryostat.
15
16
17
18
19
20

21 **Immunocytochemistry:** Antibodies for Oct-4 (mouse, 1:100, Santa Cruz) and nestin
22
23 (mouse, 1:100, Chemicon) were used to assess pluripotentiality and neural progenitor
24
25 commitment in embryonic stem cells, respectively. Briefly, cells were fixed in 4% PF
26
27 for 30 min and washed with PBS. Then, cells were incubated with Triton X-100 (0.3%)
28
29 for 5 min followed by incubation in 5% BSA/PBS 5% for 1 h. Primary antibodies were
30
31 incubated for 1 h and secondary antibody (1:400 - Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG
32
33 red, Molecular Probe) for 30 min. Images were analyzed using a fluorescent microscope
34
35 (Zeiss Axioscop 2 Plus microscope).
36
37
38
39
40
41

42 **RT-PCR:** Total RNA was isolated with Trizol reagent (Invitrogen) according to the
43
44 manufacturer's instructions, and 1 μ g was used for synthesis of cDNA. The cDNA
45
46 synthesis was carried out at 25°C for 5 min followed by 42°C for 1 h and 70° C for 15
47
48 min. The PCR was carried out using the primer sequences: OCT4 5'-AGA GCA GTG
49
50 ACG GGA ACA GAG-3'(sense), 5'-CCA ACG AGA AGA GTA TGA GGC-3'(anti-
51
52 sense); SOX2 5'-GAG AGC AAG TAC TGG CAA GAC CG-3 (sense), 5'-TAT ACA
53
54 TGG ATT CTC GCC AGC C-3' (anti-sense) and GAPDH 5'-ATC ACC ATT TCC
55
56 AGG AGC G-3' (sense), 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'(anti-sense) as
57
58
59
60

1
2
3
4 positive control. In order to provide negative controls and exclude contamination by
5
6 genomic DNA, the reverse transcriptase was omitted in the cDNA synthesis step. PCR
7
8 products were electrophoresed in agarose gel, and bands were observed with ethidium
9
10 bromide under UV light.
11
12

13
14
15
16 **Surgery and cell treatment:** Young adult female C57/Black6 mice were anesthetized
17
18 by i.p. injection of a solution containing xylazine and ketamine (15 mg/kg and 100 mg/
19
20 kg, respectively; Bayer, Brazil). A longitudinal skin incision was made to expose the
21
22 spine between T8–T10 vertebral body levels, and laminectomy was performed at the T9
23
24 level under visual guidance using an operating microscope (F104, OPTO, Brazil).
25
26 Extradural temporary closure of a vascular clip was performed (with 30 g force, Kent
27
28 Scientific Corporation, USA; Marques et al., in press) around the exposed spinal cord,
29
30 for 1 minute, to cause the acute-compression injury. Muscles and skin were sutured in
31
32 layers. The mice were left to recover on a hot pad, and returned to their home cages
33
34 with free access to food and water. Four groups were analyzed: laminectomy (Sham),
35
36 injured (SCI), cell medium (DMEM), ES-treated (EST), n = 8 each. ES pre-treated with
37
38 retinoic acid (8×10^5 cells/2 μ l) or DMEM/F12 (2 μ l) were pressure-injected via a
39
40 Hamilton syringe into the epicenter of the lesion 10 min after SCI in the EST animals or
41
42 the DMEM group, respectively.
43
44
45
46
47
48
49
50

51
52 **Histology:** After 8 weeks, the mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital
53
54 (50 mg/Kg, i.p.), and perfused intracardiacally with a solution of 4% paraformaldehyde
55
56 and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Spinal cords were dissected
57
58 in 2 segments (epicenter of the lesion plus rostral area, and epicenter of the lesion plus
59
60

1
2
3
4 caudal area) and processed for light microscopy (LM); or dissected in 3 segments
5
6 (epicenter of the lesion, rostral and caudal to it) and processed for electron microscopy
7
8 (EM). For LM, spinal-cord segments, each about 1 cm long, were embedded in OCT
9
10 (Tissue Tek), and ten-micrometer-thick serial cross sections were obtained with a
11
12 cryostat (Leica CM 1850, Germany) and collected on gelatin-coated glass slides.
13
14 Sections were stained with Luxol Fast Blue (LFB) and Kluver-Barrera (LFB plus Nissl;
15
16 Kluver and Barrera, 1953) to analyze white-matter sparing and signs of neuron damage,
17
18 respectively. Sections were observed under a Zeiss Axioscop 2 Plus microscope and
19
20 photographed with a Zeiss Axiocam MRC camera, using the Axiovision program,
21
22 version 4.5 (Zeiss) for image acquisition. Some sections were washed in 0.1 M
23
24 phosphate buffer saline (pH 7.4), three times, and incubated with DAPI for nuclear stain
25
26 (1:2000, Sigma, applied for 10 minutes, washed, and mounted with n-propylgallate) for
27
28 counterstaining with cell tracer-labeled stem cells, and were observed under a
29
30 fluorescence microscope (Zeiss Axioscop 2 Plus). For EM, the spinal-cord segments
31
32 and pellets of cultured pre-treated embryonic cells were post-fixed by immersion in
33
34 cacodylate-buffered 1% osmium tetroxide with 0.8% potassium ferrocyanide for 7 h, at
35
36 room temperature. Tissue was washed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), dehydrated
37
38 through a graded acetone series, embedded in PolyBed 812 resin (Polysciences Inc.,
39
40 USA), and polymerized at 60°C for 48 h. Ultrathin sections were obtained on a RMC
41
42 ultramicrotome, collected on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate,
43
44 and observed and photographed by means of a Zeiss 900 Transmission Electron
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Microscope.

1
2
3
4
5 **Morphometric evaluation:** We used two types of quantification analyses: white-matter
6 sparing in LFB-stained sections, and the number of preserved myelinated nerve fibers in
7 semi-thin transverse spinal cord sections, from the Sham, SCI and EST groups. White
8 Matter Sparing was quantified from LFB-stained serial cross sections from one of every
9 5 slides (each slide contained 10 μm sections spaced 50 μm apart, $n=3$ for each
10 analyzed group), rostrally and caudally from the epicenter of the lesion, covering a total
11 of 1.5 cm segment, and observed under a light microscope (Zeiss Axioscop 2 Plus). The
12 spared white matter was calculated as total cross-sectional spinal cord area minus LFB
13 non-stained area, and reported in square millimeters, as a percentage of the total cross-
14 sectional area. For the quantification of the preserved myelinated nerve fibers, semi-thin
15 sections (500 nm) were cut from the epicenter of the lesion of each analyzed group
16 (Sham, SCI, and EST, $n=5$ each), stained with Toluidine Blue, and viewed using a Zeiss
17 Axioscop 2 Plus microscope. Digital images were taken at 1,000 x magnification. Six
18 image fields per animal were chosen in the equivalent lateral and anterior white-matter
19 areas. Normal myelinated nerve fibers were counted in a blinded manner by two
20 persons, from the Sham, SCI, and EST groups ($n=3$ each). These quantifications were
21 performed using the JAVA software (Jandel Video Analysis Software, Jandel Scientific,
22 USA). For statistical analysis, data were analyzed in GraphPad Prism 4.0 (GraphPad
23 software, USA) using a one-way ANOVA and Tukey's test for all post-hoc
24 comparisons; results were expressed as mean \pm SEM; p value was considered
25 significant when ≤ 0.05 .

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 **Behavioral testing:** We performed two types of tests, global mobility (Marques et al.,
57 in press) and locomotor performance using the Basso Mouse Scale (BMS; Basso et al.,
58
59
60

1
2
3
4
5 2006). The animals were acclimated and scored for each test used, before injury, 24 h
6
7 after injury, and then weekly up to 8 weeks post-injury. Global mobility was assessed
8
9 by videotape with a WebCam (5 frames per second, for 1 min; KMEX, USA) using the
10
11 free K3CCD software, and quantified using JAVA software (Jandel Video Analysis
12
13 Software, Jandel Scientific, USA; in press). BMS was used as previously described for
14
15 locomotor analysis (BMS; Basso et al., 2006). The animals were placed in an open-field
16
17 cage (90 cm diameter X 15 cm high), free of any tactile stimulation, and observed by
18
19 two raters (blinded to the treatment) for 4 min in order to assess their performance using
20
21 this scale. For statistical analysis, we used the mean of the left and right hindlimb (HL)
22
23 scores to fix a single score per mouse. We used one-way ANOVA and Tukey's test for
24
25 post-hoc comparisons.
26
27
28
29
30
31
32

33 RESULTS

34
35
36
37 **Cell Culture and Pre-Differentiation:** Embryonic stem cells (ES) are a population of
38
39 pluripotent cells that are derived from the inner cell mass of preimplantation embryos.
40
41 To define these cells, two properties are required: i) indefinite capability of self-renewal
42
43 and ii) the ability to differentiate into all cell types of an adult organism (Thomson et
44
45 al., 1998; Reubinoff et al., 2000). Murine embryonic stem cells (ES) grow as
46
47 undifferentiated colonies that express pluripotent markers such as OCT-4 and SOX-2
48
49 (Figure 1 A-B), both transcriptional factors. To induce differentiation, MEFs are
50
51 removed and ES, plated on non-adherent plates, begin to aggregate in a three-
52
53 dimensional structure called embryoid bodies (EB, Figure 1C), (Zhou et al., 2005).
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 After retinoic acid (RA) treatment, nestin positive neural progenitors are observed
5 within EB (Figure D-E), which were dissociated and transplanted (8×10^4 cells/ $2 \mu\text{l}$).
6
7
8
9

10
11 **Light Microscopy:** Spinal-cord cross sections from the Sham group, at 56 days after
12 injury, showed normal cytoarchitecture, with clear delimitation between white and gray
13 matter and normal cellularity (data not shown). In the EST group, at 56 days after
14 injury, ES cells labeled with Cell Tracer[®] appeared in the epicenter of the lesion and
15 surrounding area (rostral and caudal to the lesion) (Figure 1F, G). These labeled areas
16 showed a higher cellularity in DAPI staining (Figure H), and were not detected in any
17 other group analyzed. These data suggest that these labeled areas correspond to the ES
18 grafted cells labeled with Cell Tracer[®] that we injected immediately after injury. The
19 presence of stem cells within the spinal cord after almost 2 months, indicate that they
20 are viable and interacting with the host tissue.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Functional analyses:** To assess functional recovery following spinal-cord injury,
39 animals were assessed in an open field over 8 weeks, using the global mobility test and
40 BMS scores.
41
42
43

44 **Global Mobility Analysis:** All the injured animals showed flaccid paralysis 1 day after
45 injury, with serious compromising of their ability to move forward. Initially, these
46 animals showed lateral movements on their own axis (Figure 2A and B), independent of
47 which treatment they had received. The Sham group showed no alteration in their
48 locomotor behavior after laminectomy. They maintained a constant exploratory pattern,
49 crossing the full length of the open field, and maintained the locomotor speed
50 (15.80 ± 0.3887 , mean \pm SEM, Figure 1I) during the assessment period. Sham mobility
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 was similar to the mobility shown by all animals during the pre-test before injury
5
6 (Figure 2C). At 7 days after injury, restriction of the exploratory task persisted in SCI
7
8 mice (Figure 2D), and DMEM animals showed the same locomotor behavior. However,
9
10 EST animals performed better than the DMEM group. After the first week, injured
11
12 animals began exploratory activity through the open field (Figure 2D-I), mainly using
13
14 their forelimbs for locomotion. The locomotor speed increased progressively (SCI,
15
16 5.581 ± 0.2905 ; DMEM, 5.705 ± 0.2848 ; EST, 10.73 ± 0.9076) during the experimental
17
18 period, but did not reach the normal pattern. Global mobility analysis showed
19
20 significant differences among the four groups studied (Figure 2J). The Sham group was
21
22 significantly different at all time points compared to the other groups ($p < 0.001$). EST
23
24 animals also differed significantly from the other injured groups, and it was possible to
25
26 detect this difference at 7 days after injury ($p < 0.01$ until 14 days, and $p < 0.001$ after 21
27
28 days). By 21-56 days after injury, there was a clear difference in locomotor and
29
30 exploratory behavior between SCI and EST animals (Figure 2F - I). SCI and DMEM
31
32 animals showed limited spontaneous recovery, and reached a plateau 3–4 weeks
33
34 following injury, with no significant improvement in global mobility after that. By 8
35
36 weeks post-injury, these groups did not yet show any statistically significant differences
37
38 among each other ($p > 0.05$). From that time onward, muscle atrophy and structural
39
40 deformities, such as scoliosis, were evident.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **Open-field locomotion and BMS score:** The BMS provides a reliable gross motor
52
53 assessment, and was developed for use in mice (Basso et al., 2006). All mice used in
54
55 this study showed a maximum BMS score (score 9) during assessment before the lesion.
56
57 A line graph shows the comparative results among the four groups studied (Figure 2K).
58
59
60

1
2
3
4 The Sham group showed no obvious deficits after recovery from anesthesia, and
5 exhibited normal locomotion and a higher BMS score throughout the assessment period
6 (BMS score 9, 8.981 ± 0.01852 , \pm SEM). Immediately after SCI, all injured groups
7 showed flaccid paralysis with no hindlimb movement, and generally maintained this
8 pattern 1 day post-surgery (BMS score 0). Some SCI and DMEM animals only
9 improved to the BMS intermediate phase, with no further functional improvement. The
10 SCI (2.037 ± 0.3994) and DMEM (2.111 ± 0.3889) groups recovered a slight ankle
11 movement during the first week post-injury, until day 10 or 15 (BMS score 1), and
12 afterwards showed improvement until they became able to step. During the first 3
13 weeks, this group recovered extensive ankle movement (BMS score 2), and some
14 animals reached dorsal stepping (BMS score 3). By 5 - 8 weeks after injury, they
15 demonstrated frequent dorsal stepping (BMS score 3) or occasional plantar stepping
16 (BMS score 4), but without any coordination. EST animals (3.872 ± 0.7112) reached
17 extensive ankle movement about 14 days after injury, and showed better improvement,
18 reaching the final phase of recovery with frequent plantar stepping, weight support and
19 some coordination, between the fourth and fifth week. Also, EST animals showed less
20 atrophy and scoliosis during the study period than did the SCI and DMEM groups.
21 Statistical analysis indicated significant differences among the Sham ($p < 0.001$), EST
22 ($p < 0.01$), and the injured groups (SCI and DMEM). There was no statistical difference
23 between the SCI and DMEM groups ($p > 0.05$).

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 **White-Matter Sparing:** Loss of LFB-stained areas was observed in all injured groups.

57
58 Interestingly, the EST group showed better preservation and distribution of white
59
60

1
2
3
4 matter. Quantification of the spared white matter (Figure 3A-B) showed significantly
5
6 better preservation in the EST group (46.80 ± 1.242), compared to the SCI group
7
8 (39.97 ± 0.9252 , $p < 0.001$). The Sham group (52.73 ± 0.5116) showed a normal pattern of
9
10 white-matter distribution. White-matter sparing was described in terms of the
11
12 percentage of white matter in relation to the total spinal cord area of the injured area.
13
14
15
16
17

18
19 **Normal Myelinated Nerve Fiber:** Figures 3C-3E show semi-thin transverse sections
20
21 of white-matter spinal cords from normal (3C), SCI (3D), and EST (3E) groups. The
22
23 Sham group showed the normal fiber count ($1,295 \pm 79.31$, Figure 3C), and differed
24
25 significantly from the other groups ($p < 0.001$). Almost total loss of nerve fibers was
26
27 observed in all non-treated animals, and this was accompanied by intense gliosis and
28
29 structural disorganization (Figure 3D). However, the EST group (Figure 3E) showed
30
31 better structural organization and more fibers. Although the SCI group also showed
32
33 preserved myelinated fibers, they were usually of smaller caliber than those found in the
34
35 EST group. Quantification of the number of myelinated nerve fibers (Figure 3F) showed
36
37 significantly more nerve fibers in the EST group (279.4 ± 16.33), compared to the SCI
38
39 group (81.39 ± 8.078 , $p < 0.05$).
40
41
42
43
44
45
46

47
48 **Electron Microscopy:** Ultrastructural observation of pellets of the pre-treated cells
49
50 prior to transplantation, showed different cell profiles (Figure 4). Some cells showed
51
52 dark electron-dense cytoplasm (Figure 4A), whereas others contained electron-lucent
53
54 cytoplasm (Figure 4B). We also observed cells with large cytoplasm, exhibiting a
55
56 conspicuous Golgi complex and rough endoplasmic reticulum, and nuclei with
57
58
59
60

1
2
3
4 prominent nucleoli (Figure 4C). Some cells displayed microtubules in the electron-
5
6 lucent cytoplasm.
7

8
9 Figure 5 is representative of the ultrastructural findings observed in spinal-cord cross
10
11 sections from the SCI and EST groups, at 56 days after injury. Ultrastructural
12
13 observation of spinal cords from SCI and EST animals, at 56 days after injury, revealed
14
15 profound disorganization and loss of nerve fibers in the SCI group (Figure 5A,C);
16
17 whereas in the EST group, the loss of fibers was less intense and it was still possible to
18
19 find normal neurons (Figure 5B,D), which were making synaptic contacts. We also
20
21 observed remyelination of axons by oligodendrocytes (Figure 5E) and Schwann cells
22
23 (SC, Figure 5E, insert) in the SCI group. In the EST group, we found some profiles
24
25 associated with large nuclei and being myelinated in a pattern characteristic of PNS
26
27 (Figure 5F and insert). These cells, however, did not contain electron-dense cytoplasm
28
29 or conspicuous basal laminae, which are typical of Schwann cells, when compared to
30
31 typical SC (Figure 5G). We also observed, in the cell-treated group, cells with large and
32
33 dark cytoplasm filled with several organelle profiles, making synapses with adjacent
34
35 profiles (Figure 6A). These cells were somewhat similar to one of the cells that we
36
37 found in the pellets (see Figure 4). Cells resembling young oligodendrocytes (Figure
38
39 6B) were also observed remyelinating naked axon profiles. These cells contained
40
41 microtubules in the cytoplasm, and also closely resembled another type of cells found in
42
43 the pellet of embryonic cells (Figure 4B).
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

The main results of this study are that the transplantation of retinoic acid pre-differentiated embryonic stem cells immediately after a compressive spinal cord injury: 1) increases the amount of spared white matter; 2) increases the number of myelinated nerve fibers and 3) significantly improves motor functional outcome.

Differently from the peripheral nervous system, which shows adequate regeneration after injury, the central nervous system (CNS) is said to have an abortive regeneration. David and Aguayo (1981) showed long-distance axonal outgrowth from intrinsic CNS neurons in the presence of the appropriate microenvironment of the peripheral nervous tissue, but this growth stopped shortly after entrance into the CNS milieu. Changes in the CNS tissue microenvironment after a lesion include release of inhibitory molecules from the central myelin as well as proteoglycans associated with astroglial scarring. These changes limit the spontaneous reorganization of the neural pathways and abort effective regeneration (Bregman et al., 1995; Camand et al., 2004; Fischer et al., 2004; Yiu and Li, 2006). Basic advances in CNS injury and regeneration research have led to a variety of experimental therapies, which allow effective axonal regrowth and sprouting (Bradbury et al., 2002; Reier, 2004; Arataki et al., 2005; Bradbury and McMahon, 2006; Schwab et al., 2006). These approaches aim to diminish the progression of the secondary events, replacing lost tissues, and increasing the intrinsic regenerative potential of endogenous progenitor cells. Among these interventions, cell-based approaches have the most translational potential for spinal-cord functional repair, because they involve both regenerative and replacement approaches (Myckatyn et al.,

1
2
3
4 2004; Nistor et al., 2005; Martino and Pluchino, 2006). Stem cells may replace lost
5
6 cells, and can provide neurotrophic factors and substrates that are needed for nervous-
7
8 system regeneration (Liu et al., 2000; Reier, 2004; Roskams and Tezlaff, 2005).
9
10

11
12
13
14 Different stem cell types have been used as therapeutic strategies after nervous system
15
16 injury. Embryonic stem cells have been used as a neuronal cell source in several
17
18 therapies based studies based on cell replacement (Correia et al., 2005; Sonntag and
19
20 Sanchez-Pernaute 2006; Wang et al., 2006; Zeng and Rao 2006) promoting some level
21
22 of locomotor and hemiplegia recovery in animal models (McDonald et al., 1999; Chiba
23
24 et al., 2003; McDonald et al., 2004).
25
26
27

28
29
30 A concern regarding the transplantation of ES is the optimal degree of
31
32 differentiation. While directed differentiation of stem cells to high purity lineages has
33
34 been described (Keirstead et al 2005; Nistor et al, 2005), a lineage restriction to the
35
36 progenitor stage could be enough to limit tumor formation with better response to the
37
38 environment and enhanced capacity for integration (Coutts and Keirstead, 2007).
39
40 Retinoic acid-treated ES cells are committed to the neural lineage (Liu et al, 2000,
41
42 Nistor et al, 2005, Nishikawa et al., 2007). Some studies already described the
43
44 transplantation of RA pre-differentiated ES, without however evaluating either the
45
46 ultrastructure of pre-differentiated ES prior grafting or remyelination pattern after
47
48 grafting (McDonald et al., 1999). Here, we differentiated ES into neural progenitors
49
50 with a 2-/4+ retinoic acid treatment protocol (Bibel et al modified protocol, 2007) and
51
52 analyzed the ultrastructure of SCI sites prior and after transplantation, which was
53
54 correlated with motor functional improvement.
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 An important issue in terms of cell-based therapies is the viability and fate of the grafted
5 cells. In our experiments, it was still possible to detect, in the epicenter of the lesion,
6 and rostral and caudal to it, Cell Tracer[®] labeled ES, 56 days after grafting. This finding
7 supports the supposition that the injected cells are able to survive and interact with the
8 host tissue, raising the possibility that the improvement in function and white-matter
9 sparing, as observed in our treated group, is directly or indirectly related to the presence
10 of and benefits provided by these cells. In accordance with our results, several
11 researchers have described the capacity of stem cells to survive for long periods and to
12 interact with the host tissue after grafting (Lee et al., 2003; Cízkova et al., 2006).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 In the present work, we used a reliable compressive experimental model to cause SCI.
29 This model maintains the continuity of the spinal cord and allows evaluation of the
30 functional recovery after treatment. White-matter sparing is frequently related to the
31 severity of injury in SCI research, because of the appropriate correlation with the
32 locomotor function (Bresnahan et al., 1991; Fehlings and Tator, 1995; Ma et al., 2001;
33 Scheff et al., 2003; Basso et al., 2006; Karimi-Abdolrezaae, 2006). The final functional
34 outcome is often directly related to the extent of remaining myelinated nerve tracts
35 (Ronsyn et al., 2008) and/or proper and efficient remyelination of spared axons,
36 resulting in a better functional locomotor outcome in experimental models of SCI.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 oligodendrocytes (Liu et al., 2000; Myckatyn et al., 2004; Keirstead et al., 2005; Nistor
5
6 et al., 2005). These new oligodendrocytes may be responsible for the remyelination of
7
8 axons that have lost their myelin sheath due to oligodendrocyte death or sickness. Given
9
10 that we also found Schwann cells myelinating spared axons, these cells might also be
11
12 responsible for the increased white matter and better functional outcome observed in our
13
14 treated animals. Schwann cells can come from the PNS or from direct differentiation of
15
16 the transplanted cells (Akiyama et al., 2002). However, we cannot rule out the
17
18 possibility that Schwann cells and/or oligodendrocytes could have arisen from the
19
20 subventricular host stem-cells, as previously demonstrated by other workers (Keirstead
21
22 et al., 1999; Akiyama et al., 2001). Electrophysiological studies show that axons
23
24 remyelinated by either oligodendrocytes or Schwann cells can properly conduct the
25
26 action potentials (Akiyama et al., 2002). Peripheral myelin has, however, the advantage
27
28 of having neither the antigenic properties of oligodendrocytes nor the antiregenerating
29
30 proteins of central myelin. Therefore, the participation of Schwann cells in the
31
32 remyelination of spared axons may have had a positive effect on the improved
33
34 functional outcome of our EST animals.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Another possible explanation for the larger areas of white matter and better functional
46
47 outcome in our cell-treated group is that the embryonic stem cells could release
48
49 neurotrophic factors that would either rescue axons from Wallerian degeneration after
50
51 injury, or enhance axonal growth in surviving neurons. Under the influence of grafted
52
53 stem cells, neurons and axons can survive and form new connections that will improve
54
55 function (Cummings et al., 2005). Our EM results favor these hypotheses, because we
56
57 were able to observe many myelinated nerve fibers, healthy-appearing neurons, and
58
59
60

1
2
3
4 typical synaptic contacts in the animals that received the ES. However, we cannot rule
5
6 out the possibility that functional recovery was at least partly due to infralésional
7
8 plasticity after SCI (Lapointe et al., 2007). Previous studies have reported the existence
9
10 of central pattern generator (CPG) neurons in lumbar segments (L1-L2) of mouse spinal
11
12 cord (Nishikumar and Kudo, 2000). These neurons, upon proper stimulation, can
13
14 generate limb movements even in the complete absence of descending influence, as in
15
16 the case of total spinal cord transection (Lapointe et al., 2007). After SCI there is
17
18 increased expression of immediate early genes (IEG), such as c-jun and nor-1,
19
20 neurotrophic factors and others, in areas below the level of injury, which might excite
21
22 the CPG neurons, giving rise to limb movements (Lapointe et al., 2007).
23
24
25
26
27
28
29

30 An intriguing finding in this study was the observation, under the electron microscope,
31
32 of axons either undergoing remyelination or fully remyelinated by cells that had
33
34 ultrastructural characteristics of Schwann cells, particularly in the manner in which they
35
36 were contacting the axons. However, these cells contained much lighter cytoplasm than
37
38 typical Schwann cells, which could be observed in the neighboring areas, and lacked a
39
40 visible basal lamina, which is a hallmark of these cells. It is tempting to suggest that
41
42 these cells are not originated by PNS cells, but either from the grafted cells or from host
43
44 subventricular stem cells. An alternative explanation is the possibility that they are very
45
46 young and therefore have not yet developed a typical basal lamina.
47
48
49
50
51
52
53

54 The most reliable method to evaluate functional recovery after a lesion is the use of an
55
56 appropriate functional test. Our functional evaluation included the Basso mouse scale
57
58 and the global mobility test. BMS was developed to assess the return of locomotor
59
60

1
2
3
4 function in mice (Basso et al., 2006). This scale is both sensitive and reliable in
5
6 detecting discrete differences among the analyzed groups. However, since the BMS is a
7
8 subjective test, and therefore susceptible to error, we decided to use a non-subjective
9
10 test to check our results in terms of locomotor and functional recovery. Therefore, we
11
12 also used the global mobility test (Marques et al., in press), as a quantitative and
13
14 nonsubjective analysis of the locomotor outcome. This assessment allowed us to
15
16 measure the real gain in the animal's ability to freely walk around an open field, and
17
18 also allowed us to quantify the walking speed and global locomotor performance. Our
19
20 results using the non-subjective global mobility test confirmed those obtained by the
21
22 BMS analysis, giving support and strength to the described functional improvement.
23
24 EST animals showed, in both functional tests, a statistically significant improvement in
25
26 the locomotor recovery compared to the other injured groups. The SCI and DMEM
27
28 groups showed limited improvement, and they appeared to reach a plateau at about 3-5
29
30 weeks. This performance is similar to that reported by many authors. Accordingly, it
31
32 has been said that there is a tendency to improve until a plateau is reached at about 4
33
34 weeks after injury, independently of the experimental injury model used (von Euler et
35
36 al., 1997; Scheff et al., 2003; Basso et al., 2006). EST animals showed the best recovery
37
38 compared to the other groups, because they achieved the final phase of locomotor
39
40 recovery in BMS assessment. This plateau was reached at about 42 days after injury and
41
42 treatment.
43
44
45
46
47
48
49
50

51
52
53 In conclusion, in this study we demonstrated the therapeutic potential of acute
54
55 transplantation of neural progenitors differentiated from ES in promoting functional
56
57 recovery and increasing the amount of white matter after CNS injury. Such grafts might
58
59 be possibly applied in future experimental studies as human therapeutic strategies in
60

1
2
3
4 acute SCI. This functional improvement was probably related to either remyelination of
5
6 spared axons, or rescuing of nerve fibers which would otherwise undergo axonal
7
8 degeneration.
9

10
11
12
13
14
15
16 **ACKNOWLEDGMENTS: We wish to acknowledge Dr Mauricio Paredes for the**
17
18 **specialized assistance during animal surgeries and for the veterinary care. The**
19
20 **technical help given by Klaus Mostacada and Jorge Luis da Silva is very much**
21
22 **appreciated. We also thank Rodrigo Madeiro and Fernanda Martins Almeida for**
23
24 **helping us in many stages of this project. This study was supported by CNPq,**
25
26 **CAPES, Ministério da Saúde, and FAPERJ.**
27
28
29
30
31
32
33

34 35 REFERENCES

- 36
37
38 Akiyama, Y., Honmou, O., Kato, T., Hashi, K., and Kocsis, J.D. (2001).
39
40 Transplantation of clonal neural precursor cells from adult human brain establishes
41
42 functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* **167**, 27-39.
43
44
45 Akiyama, Y., Radtke, C., and Kocsis, J.D. (2002). Remyelination of the rat spinal cord
46
47 by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J. Neurosci.*, **22**, 6623-
48
49 6630.
50
51
52 Arataki, S., Tomizawa, K., Moriwaki, A., Nishida, K., Matsushita, M., Ozaki, T.,
53
54 Kunisada, T., Yoshida, A., Inoue, H., and Matsu, H. (2005). Calpain inhibitors
55
56 prevent neuronal cell death and ameliorate motor disturbances after compression-
57
58 induced spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma*, **22**, 398-406.
59
60

- 1
2
3
4
5 Au, E., Richter, M.W., Vincent, A.J., Tetzlaff, W., Aebersold, R., Sage, E.H., and
6
7 Roskams, J. (2007). SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann
8
9 cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J. Neurosc.*, **27**,
10
11 7208 –7221.
12
- 13
14 Basso, D.M., Fischer, L.C., Anderson, A.J., Jakeman, L.B., McTigue, D.M., and
15
16 Popovich, P.G. (2006). Basso mouse scale for locomotion detects differences in
17
18 recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J. Neurotrauma*, **23**
19
20 (5), 635-659.
21
- 22
23 Bibel, M., Richter, J., Lacroix, E., and Barde, Y.A; (2007). Generation of a defined and
24
25 uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem
26
27 cells. *Nat. Protoc.*, **2**, 1034-1043.
28
- 29
30 Biernaskie, J., Sparling, J.S., Liu, J., Shannon, C.P., Plemel, J.R., Xie, Y., Miller, F.D.,
31
32 and Tetzlaff, W. (2007) Skin-derived precursors generate myelinating Schwann
33
34 cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord
35
36 injury. *J. Neurosc.*, **27**, 9545–9559.
37
- 38
39
40 Bradbury, E.J., and McMahon, S.B. (2006) Spinal cord repair strategies: why do they
41
42 work? *Nature Reviews*, **7**, 644-653.
43
- 44
45 Bradbury, E.J., Moon, L.D., Ppopat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N.,
46
47 Fawcett, J.W., and McMahon, S.B. (2002) Chondroitinase ABC promotes
48
49 functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, **416**, 636-640.
50
- 51
52 Bregman, B.S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H.N., Gao, D., and Schwab, M.E.
53
54 (1995). Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth
55
56 inhibitors. *Nature*, **378**, 498-501.
57
- 58
59 Bresnahan, J.C., Beattie, M.S., Stokes, B.T., and Conway, K.M. (1991). Three-
60

1
2
3
4 dimensional computer-assisted analysis of graded contusion lesions in the spinal
5 cord of the rat. *J. Neurotrauma*, **8**, 91-101.

6
7
8
9 Camand, E., Morel, M-P., Faissner, A., Sotelo, C., and Dusart, I. (2004). Long-term
10 changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of
11 serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *Europ. J.*
12
13
14
15
16 *Neurosc.*, **20**, 1161–1176.

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
Casha, S., Yu, W.R., and Fehlings, M.G. (2001). Oligodendroglial Apoptosis Occurs
along Degenerating Axons and is Associated with Fas and P75 Expression
Following Spinal Cord Injury in the Rat. *Neurosc*, **103**, 203-218.

Chiba, S., Iwasaki, Y., Sekino, H., and Suzuki, N. (2003). Transplantation of
motoneuron-enriched neural cells derived from mouse embryonic stem cells
improves motor function of hemiplegic mice. *Cell Transplant*, **12**, 457-468..

Cízkova, D., Rosocha, J., Vanický, I., and Jergová, S. (2006). Transplant of human
mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the
rat. *Cell Molec. Neurobiol*, **26**, 1167-1180.

Correia, A.S., Anisimov, S.V., Li, J.Y., and Brundin, P. (2005). Stem cell-based therapy
for Parkinson's disease. *Ann. Med.*, **37**, 487-498.

Coutts, M., and Keirstead, H.S. (2008). Stem cells for the treatment of spinal cord
injury. *Exp. Neurol.*, **209**, 368-377.

Cummings, B.J., Uchida, N., Tamaki, S.J., Salazar, D.L., Hooshmand, M, Summers, R.,
Gage, F.H., and Anderson, A.J. (2005). Human neural stem cells differentiate and
promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *PNAS*, **39**, 14069-14074.

David, S., and Aguayo, A.J. (1981). Axonal elongation into peripheral nervous system
“bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science* **214**, 931–933.

- 1
2
3
4 Fehlings, M.G., and Tator, C.H. (1995). The relationships among the severity of spinal
5
6 cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely
7
8 labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, **132**, 220- 228.
9
10
11 Fischer, D., He, Z., and Benowitz, L.I. (2004). Counteracting the nogo receptor
12
13 enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth
14
15 state. *J. Neurosci.*, **24**, 1646-1651.
16
17
18 Karimi-Abdolrezaee, S., Eftekharpour, E., Wang, J., Morshead, C.M., and Fehlings,
19
20 M.G. (2006). Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes
21
22 remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J.*
23
24 *Neurosci.*, **26**, 3377–3389.
25
26
27
28 Keirstead, H.S., Ben-Hur, T., Rogister, B., O’Leary, M.T., Dubois-Dalcq, M., and
29
30 Blakemore, W.F. (1999). Polysialylated neural cell adhesion molecule-positive CNS
31
32 precursors generate both oligodendrocytes and Schwann cells to remyelinate the
33
34 CNS after transplantation. *J. Neurosci.*, **19**, 7529-7536.
35
36
37
38 Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward,
39
40 O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell
41
42 transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci.*,
43
44 **25**, 4694-4705.
45
46
47
48 Kluver, H., and Barrera, E. (1953). A method for the combined staining of cells and
49
50 fibers in the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **12**, 400-403.
51
52
53 Kwon, B.K., Tetzlaff, W., Grauer, J.N., Beiner, J., and Vaccaro, A.R. (2004).
54
55 Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J.*,
56
57 **4** (4), 451-464.
58
59
60 Lapointe, N.P., Ung, R-V., and Guertin, P.A. (2007). Plasticity in sublesionally located

- 1
2
3
4 neurons following spinal cord injury. *J. Neurophysiol.*, **98**, 2497-2500.
- 5
6
7 Lee, J., Kuroda, S., Shichinohe, H., Ikeda, J., Seki, T., Hida, K., Tada, M., Sawada, K-
8
9 I., and Iwasaki, Y. (2003). Migration and differentiation of nuclear fluorescence-
10
11 labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and
12
13 spinal cord injury in mice. *Neuropathology*, **23**, 169-180.
- 14
15
16 Lim, J-H., Byeon, Y-E., Ryu, H-H., Jeong, Y-H., Lee, Y-W., Kim, W.H., Kang, K.S.,
17
18 and Kweon, O-K. (2007). Transplantation of canine umbilical cord blood-derived
19
20 mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J. Vet.*
21
22 *Sci.*, **8**, 275-282.
- 23
24
25
26 Liu, S., Qu, Y., Stewart, T.J., Howard, M.J., Chakraborty, S., Terrence, F., Holekamp,
27
28 T.F., and McDonald, J.W. (2000). Embryonic stem cells differentiate into
29
30 oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation.
31
32 *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **97**, 6126–6131.
- 33
34
35 Ma, M., Basso, D.M., Walters, P., Stokes, B.T., and Jakeman, L.B. (2001). Behavioral
36
37 and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the
38
39 c57bl/6 mouse. *Exp. Neurol.*, **169**, 239-254.
- 40
41
42 Marques, S. A., Garcez, V., Del Bel, E., Martinez, A.M.B. A simple, inexpensive and
43
44 easily reproducible model of spinal-cord injury in mice: functional and
45
46 morphological assessments. *J. Neurosci. Meth.* (in press).
- 47
48
49 Martino, G., and Pluchino, S., (2006). The therapeutic potential of neural stem cells.
50
51 *Nature Reviews*, **7**, 395-406.
- 52
53
54 McDonald, J.W., and Sadowsky, C. (2002). Spinal cord injury. *Lancet*, **359**,417-425.
- 55
56
57 McDonald, J.W., Becker, D., Holekamp, T.F., Howard, M., Liu, S., Lu, A., Platik,
58
59 M.M., Qu, Y., Stewart, T., and Vadivelu, S. (2004). Repair of the injured spinal
60

1
2
3
4 cord and the potential of embryonic stem cell transplantation. *J. Neurotrauma*,
5
6 **21**,383-393.
7

8
9 McDonald, J.W., Liu, X.Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S.K., Turetsky, D., Gottlieb, D.I.,
10
11 and Choi, D.W. (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate
12
13 and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.*, **5**,1410-1412.
14

15
16 Myckatyn, T.M., Mackinnon, S.E., and McDonald, J.W. (2004). Stem cell
17
18 transplantation and other novel techniques for promoting recovery from spinal cord
19
20 injury. *Transplant Immunol.*, **12**, 343-358.
21

22
23 Nishikawa, S-I., Jakt, L.M., and Era, T. (2007). Embryonic stem-cell culture as a tool
24
25 for developmental cell biology. *Nature Reviews*, **8**, 502-507.
26

27
28 Nishikumar, H., and Kudo, N. (2000). Formation of the central pattern generator for
29
30 locomotion in the rat and mouse. *Brain Res. Bull.*, **53**, 661-669.
31

32
33 Nistor, G.I., Totoui, M.O., Haque, N., Carpenter, M.K., and Keirstead, H.S. (2005).
34
35 Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and
36
37 myelinated after spinal cord transplantation. *Glia*, **49**, 385-396.
38

39
40 Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., and Okano, H. (2004). Retinoic-acid-dependent
41
42 acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic
43
44 stem cells. *Development. Biol.*, **275**, 124-142.
45

46
47 Priebe, M.M., Chiodo, A.E., Scelza, W.M., Kirshblum, S.C., Wuermsler, L-A, and Ho,
48
49 C.H. (2007). Spinal cord injury medicine. 6. economic and societal issues in spinal
50
51 cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **88 (s1)**, s84-s88.
52

53
54 Reier, P.J. (2004). Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and
55
56 translational neurobiology. *J. Am. Soc. Exp. Neuro. Therapeut.*, **1**, 424-451.
57
58
59
60

- 1
2
3
4 Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000).
5
6 Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro.
7
8 Nat. Biotechnol., **18**, 399–404.
9
10
11 Ronsyn, M.W., Berneman, Z.N., Van Tendeloo, V.F.I., and Ponsaerts, P. (2008). Can
12
13 cell therapy heal a spinal cord injury? *Spin. Cord*, **46**, 532-539.
14
15
16 Roskams, A.J., and Tetzlaff, W. (2005). Directing stem cells and progenitor cells on the
17
18 stage of spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, **193**, 267-272.
19
20
21 Scheff, S.W., Rabchevsky, A.G., Fugaccia, I., Main, J.A., and Lumpp, J.E. Jr. (2003)
22
23 Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined
24
25 injury device. *J. Neurotrauma*, **20**, 179–193.
26
27
28 Schwab, J.M., Brechtel, K., Mueller, C.A., Failli, V., Kaps, H.P., Tuli, S.K., and
29
30 Schluesener, H.J. (2006). Experimental Strategies to Promote Spinal Cord
31
32 Regeneration- An Integrative Perspective. *Progress in Neurobiol.*, **78**, 91-116.
33
34
35 Sekhon, L.H.S., and Fehlings, M.G. (2001). Epidemiology, demographics, and
36
37 pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, **26 (24S)**,2-12.
38
39
40 Sonntag, K.C., Sanchez-Pernaute, R. (2006). Tailoring human embryonic stem cells for
41
42 neurodegenerative disease therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, **7**,:14-618.
43
44
45 Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J.,
46
47 Marshall, V.S. and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from
48
49 human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147.
50
51
52 Toft, A., Scott, D.T., Barnett, S.C., Riddell, J.S. (2007). Electrophysiological evidence
53
54 that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury. *Brain*, **130**,
55
56 970-984.
57
58
59
60

1
2
3
4 von Euler, M., Seiger, A., and Sundstrom, E. (1997). Clip compression injury in the
5
6 spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp.*
7
8 *Neurol.*, **145**, 502-510.

9
10
11 Wang, Q., Matsumoto, Y., Shindo, T., Miyake, K., Shindo, A., Kawanishi, M., Kawai,
12
13 N., Tamiya, T., and Nagao, S. (2006). Neural stem cells transplantation in cortex in
14
15 a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Med. Invest.*, **53**,61-69.

16
17
18 Yiu, G., Li, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature Reviews*, **7**,
19
20
21 617-627.

22
23
24 Zeng, X., and Rao, M.S. (2007). Human embryonic stem cells: long term stability,
25
26 absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neurosc.*
27
28 **145**,1348-1358.

29
30
31 Zhou, Q.J., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Hu, R.Z., Lu, Y.L., Yao, H., and DAI, L.C. (2005).
32
33 Generation of embryoid bodies from mouse embryonic stem cell cultures on STO
34
35 feeder cells. *Cell Biol. Int.*, **29**, 817-825.

36 37 38 39 40 41 **LEGENDS:**

42
43
44 **Figure 1:** Differentiation of murine embryonic stem cells (ES) into nestin-enriched
45
46 embryoid bodies, and identification of ES labeled in spinal-cord injury. (A) ES colonies
47
48 labeled with Oct-4 immunostaining confirmed pluripotentiality, (B) which was also
49
50 revealed by RT-PCR for Oct-4 and Sox-2. (C) EB were formed after 2 days of culture in
51
52 suspension with LIF. (D, E) Nestin immunostaining revealed EB following 4 days of
53
54 treatment with RA (2 μ M). Red (nestin) and blue (DAPI). (F) A schematic view of the
55
56 vascular clip at the spinal cord injury site, as we used in this study. (G, H) Cell Tracer®
57
58
59
60

1
2
3
4 and DAPI stained cells at the site of lesion, 56 days after ES graft. (G) ES cells labeled
5 with Cell Tracer[®] can be detected in the epicenter of the lesion. These red areas showed
6
7 a higher cellularity in DAPI staining (H) and were not detected in other analyzed
8
9 groups.
10
11
12

13
14
15
16 **Figure 2:** Functional Analyses (A-K). Global Mobility Progression of SCI group versus
17 EST group, at different times after surgery. (A, B) All injured animals showed complete
18 flaccid paralysis 24 h after injury with improvement afterwards. (C) Pre-test, before
19 surgery, showing normal global mobility progression. (D-I) Comparison of mobility
20 progression between the SCI and EST group. At 56 days after injury, SCI (H) and EST
21 (I) groups show a clear difference in the distance travelled (blue lines) by the animals.
22
23 (J) Line graphs representing the progress of global mobility among the four groups
24 studied. Each point represents the mean for a group; the EST and Sham groups were
25 significantly different from the other groups, $p < 0.001$. (K) Line graphs representing
26 comparative Basso Mouse Scale open-field locomotion scores between the groups; the
27 EST group was significantly different from the other groups from 14 days after injury
28 onwards, $* = p < 0.001$.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 **Figure 3:** Quantitative evaluation of spared white matter in LFB stained sections (A,B)
48 and of the number of myelinated nerve fibers in toluidine-blue-stained semi-thin
49 sections (C-F). (A) A schematic view of the LFB stained spinal cord in which the dark-
50 blue area between dotted lines represents the quantified white matter area. (B) Graph
51 bars showing the morphometric results of spared white matter. The EST group showed
52 more white matter than the SCI group ($*** p < 0.001$). (C-E) Semi-thin sections of the
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 anterior funiculus from Sham (C), SCI (D) and EST (E) animals. Sham animals showed
5
6 normal fiber distribution; EST animals showed more extensive preservation compared
7
8 to the SCI animals. (F) Graph bars showing the morphometric results of the number of
9
10 preserved normal fibers. The SCI group showed fewer normal fibers than the Sham
11
12 group (*** $p < 0.001$). The EST group showed a significant increase in preserved normal
13
14 fibers compared to the SCI group (* $p < 0.05$). Scale bars = 10 μm .
15
16
17
18
19
20

21 **Figure 4:** Electron micrographs of pellets from embryonic cells (A-C). Pre-treated cells
22
23 in culture showed different cellular profiles; some cells contained electron-dense
24
25 cytoplasm (A, asterisk), whereas others contained light cytoplasm (B, star). Some
26
27 electron-dense cells showed an evident nucleolus (C, arrow). Scale bars: A and B – 1
28
29 μm and C – 0.3 μm .
30
31
32
33
34

35 **Figure 5:** Ultra-thin spinal cord sections, at 56 days after injury. In the SCI group (A,
36
37 C) there was structural disorganization, the presence of empty spaces (asterisk), and an
38
39 evident loss of myelinated nerve fibers. In the EST group (B, D) the loss of myelinated
40
41 nerve fibers was less intense, and it was still possible to find normal-appearing neurons.
42
43 Remyelination by both oligodendrocytes (E, arrow) and Schwann cells (E, insert), was
44
45 evident in the SCI (E) and EST (F, G) groups. However, we also observed, in the EST
46
47 group (F,G), cells myelinating in a SC fashion (arrowheads), but lacking electron-dense
48
49 cytoplasm and a typical basal lamina (F and insert), which are typical of Schwann cells
50
51 (G, arrows). N = neurons. Scale bars: A and B – 3 μm , C and D – 1 μm , E and insert -
52
53 0.3 μm , F- 1 μm , F insert - 3 μm and G – 0.3 μm .
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5 **Figure 6:** Ultra-thin spinal cord sections, at 56 days after injury. In (A) it is possible to
6 see a cell with dark cytoplasm (asterisk) containing many organelles, which is making
7 synaptic contacts (arrow) with an adjacent profile (star). In (B) we find a myelinating
8 cell with an approximately round nucleus and an electron-lucent cytoplasm containing
9 microtubules (arrow), resembling a young oligodendrocyte. Scale bar = 1 μ m.
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

For Peer Review

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)