

FRANCINE AURORA BONATTO

**MÚTIPLA APLICAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA
MELHORA A LOCOMOÇÃO DE RATOS COM LESÃO MEDULAR
INDEPENDENTE DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Asdrubal Falavigna

Porto Alegre, 2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO

B699m Bonatto, Francine Aurora

Múltipla aplicação de células mononucleares da medula óssea melhora a locomoção de ratos com lesão medular independente de expressão de citocinas inflamatórias / Francine Aurora Bonatto. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

81 f.: il.; graf. Inclui artigo científico encaminhado para publicação no periódico *Spine*.

Orientador: Jaderson Costa da Costa.

Co-orientador: Asdrubal Falavigna.

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

1. TRAUMA-RAQUIMEDULAR EXPERIMENTAL. 2. LESÃO MEDULAR. 3. CÉLULAS TRONCO. 4. CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA. 5. IL-1 β . 6. TNF- α . 7. ESTUDO EXPERIMENTAL. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Falavigna, Asdrubal. III. Título.

FRANCINE AURORA BONATTO

**MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA
MELHORA A LOCOMOÇÃO DE RATOS COM LESÃO MEDULAR
INDEPENDENTE DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS**

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

Aprovado em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jorge Wladimir Junqueira Bizzi

Prof. Dr. Erasmo de Abreu Zardo

Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por toda ajuda e carinho que recebi, sempre;

Ao meu querido namorado Eduardo Luis Binotto, por toda compreensão, dedicação e ajuda desde o início, você foi fundamental para concretização deste trabalho;

Agradeço ao meu orientador, Dr. Jaderson Costa da Costa, pela oportunidade de aprendizado e pela confiança dedicada a mim nesta pesquisa;

Ao meu co-orientador, Dr. Asdrubal Falavigna, pela dedicação, preocupação e empenho ao longo de todas etapas do trabalho, você foi fundamental no processo de aprendizado para desenvolver a pesquisa;

A Elisa Kaminski pelo apoio desde o início e por disponibilizar seu tempo para me ajudar;

Aos alunos e pesquisadores da UCS, por repassarem seus conhecimentos, vocês também, foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado;

Agradeço a todos colegas de laboratório, bolsistas de iniciação científica, e funcionários do Laboratório de neurociências e sinalização celular, em especial, a Simone Denise Salamoni, sempre compreensiva e disposta a ajudar em diversos momentos deste trabalho;

Agradeço em especial a bolsista de iniciação científica Marina Fiedler e a bioterista Alaiana pelos cuidados com os animais;

Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado, Michele Domingues e Fagner, obrigada pela colaboração no trabalho;

Agradeço a professora e amiga Ms.Karen Bazzo, por disponibilizar seu tempo e ajuda com a análise imunohistoquímica;

Ao funcionário Ricardo Breda pela disponibilidade em ajudar;

Ao enfermeiro Fernando Luis Binotto, pela colaboração, desde o início e também médica Neiva da Sois, por também ter ajudado quando precisei;

Obrigada aos familiares, Dirce e Alexandre Binotto, por tudo;

As minhas amigas, Juliana Comerlato, Fernanda Machado, Gabriela Barbieri e Mônica Collato. Obrigada por manterem a amizade, mesmo com tão pouco tempo com vocês neste último ano.

RESUMO

O trauma-raquimedular (TRM) é uma patologia que afeta drasticamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos, apresenta alta incidência e ocasiona um alto custo para o governo e a sociedade. Os tratamentos existentes para o TRM são apenas de cunho paliativo, não sendo capazes de reverter o dano neurológico ocasionado pelo trauma. Em função disso, é necessário investigar novas terapias que busquem soluções mais efetivas para esses pacientes.

Os estudos com células-tronco de medula óssea (CMMO) têm demonstrado resultados animadores, mas ainda não definitivos para aplicação clínica; assim, a ampliação dos estudos pré-clínicos é indispensável.

Neste estudo tivemos o objetivo de comparar os resultados do tratamento de CMMO pela via subaracnoidea (VS) através de punção lombar (PL), entre grupos com 3 aplicações e 5 aplicações de CMMO, analisando a função motora e o processo inflamatório no local da lesão.

Nossos grupos experimentais de estudo foram divididos em 2 grupos pela via de administração subaracnóidea, com tempos de transplante diferentes. Um grupo com 3 aplicações de CMMO, sendo a primeira aplicação em 48h, 9 dias e 16 dias após a lesão medular (LM) e um segundo grupo com 5 aplicações de CMMO, primeira aplicação em 48 h, 9, 16, 23 e 30 dias após a Lesão Medular (LM) pela VS e cada grupo com seu controle de veículo, solução salina (SS).

Os animais doadores eram machos e os receptores eram fêmeas. As ratas foram avaliadas quanto à função motora, através da escala de Basso, Beattie and Bresnahan (BBB), quanto à presença de CMMO na lesão, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do cromossomo Y dos animais doadores, e quanto ao processo inflamatório no local da lesão, analisando a interleucina 1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), através de imuno-histoquímica.

Nossos resultados demonstraram uma melhora da função motora nos grupos tratados com transplantes de CMMO, sendo mais rápida nos animais que receberam

cinco aplicações. A avaliação imuno-histoquímica revelou que não houve diferença na expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α no local da lesão nos grupos tratados com CMMO. A análise de PCR não demonstrou células no local da lesão, quando analisadas no 37º dia.

Palavras-chave: Trauma-raquimedular experimental, lesão medular, células tronco, células mononucleares de medula óssea, IL-1 β e TNF- α .

ABSTRACT

The spinal cord injury (SCI) is a condition that dramatically affects the quality of life of affected patients, has a high incidence and causes a high cost to the government and society. Existing treatments for SCI are only palliative nature, not being able to reverse the neurological damage caused by trauma. As a result, it is necessary to investigate new therapies that seek more effective solutions for these cases.

The studies with bone marrow mononuclear cells (BMMC) have shown encouraging results, but still not definitive for clinical application, so the expansion of preclinical studies is essential. In this study we aimed to compare treatment outcomes between groups with 3 and 5 applications BMMC applications, analyzing motor function, and inflammation at the lesion site after treatment with BMMC by subarachnoid through via lumbar puncture.

The experimental groups were divided into two groups, with different times of transplantation. A group of 3 applications of BMMC, the first application 48 hours, 9 days and 16 days after SCI and a second group with 5 BMMC applications, application in the first 48 hours, 9, 16, 23 and 30 days after by spinal cord injury. The BMMC of male wistar rats was applied via subarachnoid. The entire group received vehicle (saline).

The animals were evaluated for motor function through the BBB scale, for the presence of BMMC in the lesion by PCR for the presence of Y chromosome of the cells, and the inflammatory process at the site of injury, analyzing IL-1 β and TNF- α , by immunohistochemistry.

Our results show an improvement in motor function in the groups treated with BMMC transplants. The immunohistochemical evaluation revealed no difference in the expression of inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α at the site of injury in the groups treated with BMMC. The PCR analysis for the presence of chromosome of the cells was negative at the 37th day of the last application of BMMCs.

Keywords: Experimental model of SCI, bone marrow mononuclear cells, motor function, IL-1 β and TNF- α , spinal cord injury, stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Procedimento cirúrgico do modelo de lesão..	25
Figura 2 – Delineamento Experimental .	28
Figura 3 – Local de avaliação motora pela escala de BBB...	30
Figura 4 – Gráfico de avaliação motora .	35
Figura 5 - Gráfico dos escores motores em diferentes tempos.....	36
Figura 6 – Dados da análise imunohistoquímica das citocinas IL-1 β e TNF- α	37
Figura 7 – Imagens digitalizadas da imunohistoquímica da expressão da IL-1 β	38
Figura 8 – Imagens digitalizadas da imunohistoquímica da expressão da TNF- α	38
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para uma sequência específica do cromossoma Y de ratos.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

BBB	Escala de Avaliação Funcional BBB.
CMMO	Células mononucleares da medula óssea.
COX-2	Ciclogenase-2
CT	Células-tronco
CTMO	Células-tronco da medula óssea
IL-1 β	Interleucina-1 beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
LM	Lesão Medular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PL	Punção Lombar.
SS	Solução Salina
VS	Via Subaracnoidea
TRM	Trauma-raquimedular

SUMÁRIO

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
1.1 Trauma-raquimedular	13
1.1.1 Epidemiologia.....	13
1.1.2 Quadro clínico	14
1.1.3 Fisiopatologia	15
1.1.4 IL-1 β e TNF- α	16
1.1.5 Tratamento	18
1.2 CÉLULAS-TRONCO.....	19
1.2.1 Células tronco nas Lesões de Medula Espinhal.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Animais.....	23
3.1.1 Aspectos éticos.....	23
3.2 Modelo experimental de lesão	24
3.3 Obtenção das células tronco da medula óssea	26
3.4 Preparação das células para transplante.....	26
3.5 Vias de entrega das células mononucleares	27
3.6 Delineamento experimental	27
3.7 Avaliação funcional	29
3.8 Análise Imunohistoquímica	30
3.9 Detecção por PCR do cromossomo Y das CMMO transplantadas.....	31
3.10 Análise estatística	33

4 RESULTADOS	35
4.1 Avaliação da função motora (escala BBB).....	35
4.2 Análise Imunohistoquímica	37
4.3 Presença de células-tronco de medula óssea na região medular lesada após os transplantes.....	39
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÕES.....	45
PERSPECTIVAS FUTURAS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO 1- ARTIGO	55

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Trauma-raquimedular

O trauma-raquimedular (TRM) continua sendo a principal determinante de incapacidade permanente na população adulta, constituindo uma proporção crescente de pacientes hospitalizados com lesão medular (Mcdonald e Sadowsky, 2002b; Coutts e Keirstead, 2008; Lenehan, Street *et al.*, 2012). Define-se o TRM como a consequência de uma força física que supera a capacidade de proteção e sustentação da coluna vertebral e ocasiona uma compressão da medula espinhal, causando uma lesão que pode gerar comprometimento neurológico permanente (Mcdonald e Sadowsky, 2002a).

1.1.1 Epidemiologia

Esta patologia possui alta incidência, nos Estados Unidos, um dos países com maior incidência de TRM, somando entre 28 a 55 milhões de pessoas acometidas (Mcdonald e Sadowsky, 2002a).

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

1.1.2 Quadro clínico

De acordo com a American Spinal Injury Association (ASIA), a avaliação neurológica deve incluir escores motores, pontuações sensoriais, zona de preservação parcial, e o grau de comprometimento ou gravidade da LM (Mulcahey, Gaughan *et al.*, 2011).

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

O choque neurogênico é um tipo de choque distributivo que resulta da lesão das vias descendentes do sistema simpático da medula espinhal cervical ou torácica alta, o que ocasiona a perda do tônus vasomotor e perda da inervação simpática do coração (Guly, Bouamra *et al.*, 2008).

O termo tetraplegia refere-se à perda da função motora nos membros superiores e inferiores devido a uma lesão da medula no seu segmento cervical. A paraplegia refere-se à perda da função motora nos membros inferiores secundária a lesão do segmento torácico, lombar ou sacral da medula espinhal (Ditunno e Formal, 1994).

A disfunção autonômica das vísceras, em especial da bexiga e intestino, está associada em ambos os casos, seja de tetraplegia ou paraplegia. A lesão medular, além das disfunções descritas acima, também pode provocar outras doenças, como a osteoporose, de forma rápida grave, com alto risco de fraturas (Battaglino, Lazzari *et al.*, 2012).

1.1.3 Fisiopatologia

O TRM pode ser classificado, de acordo com o momento da lesão, em primária e secundária. A lesão primária decorre do trauma mecânico inicial, o qual é seguido por uma série de eventos celulares e moleculares secundários, lesão secundária, que resultam na progressiva degeneração do tecido medular (Eftekharpour, Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2008).

As principais funções da medula, motora, sensitiva e de atividades reflexas, podem ser interrompidas devido a infecções, alterações congênitas, doenças degenerativas, tumores, compressão vascular e eventos traumáticos, sendo esta a causa mais comum (Chehrazi, Scremin *et al.*, 1989; Tator e Koyanagi, 1997)

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

Neurônios que sofrem axotomia e têm o corpo celular localizado em núcleos distantes do sítio de lesão também podem sofrer atrofia ou mesmo morrer. Essas respostas podem ser reguladas por processos endógenos, tais como a produção de fatores neurotróficos (Basso, Beattie *et al.*, 1996).

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

Processos ativos de apoptose podem ser importantes na produção da lesão secundária do SNC causada tanto pela isquemia quanto pelo trauma (Johnson, Wei *et al.*, 1995). A microglia e o astrócito são as células que modulam o processo inflamatório no SNC. A ativação microglial ocorre durante o processo inflamatório no tecido nervoso central e, além de exercer funções macrofágicas, libera citocinas que são cruciais para a ativação astrocitária (Magnus, Chan *et al.*, 2002).

A inflamação é uma resposta de reparação e defesa universal dos tecidos que sofrem algum tipo de lesão. Na medula espinhal lesada, essa resposta envolve componentes celulares como neutrófilos, macrófagos e células T, bem como, componentes moleculares do tipo citosinas e prostaglandinas. Após a LM, a região lesada é infiltrada rapidamente por neutrófilos, os quais, ao secretar enzimas líticas e citosinas, prejudicam ainda mais o tecido local e promovem o recrutamento de outras células inflamatórias (Popovich, Wei *et al.*, 1997).

1.1.4 Interceucina 1-beta e Fator de Necrose Tumoral-alpha

O conhecimento atual sobre a plasticidade cerebral e o potencial terapêutico das células tronco (CT), possibilita uma nova estratégia terapêutica de neuroregeneração para melhorar as redes neuronais no local da lesão. O transplante de CT pode substituir populações de células perdidas, regenerar células lesadas da medula espinhal e propiciar continuidade do impulso nervoso, através da produção de citocinas ou fatores neurotróficos que facilitam a regeneração (Yoon, Shim *et al.*, 2007; Bareyre, 2008).

As lesões no SNC produzem uma resposta imunológica com liberação de várias citocinas inflamatórias com funções na regulação da proliferação, da migração e da ativação glial, assim como no recrutamento de células imunológicas para o local da lesão (Giralt, Penkowa *et al.*, 2002; Schermer e Humpel, 2002).

A inflamação local pós lesão é crucial para defesa e reparo do tecido acometido. Entre as substâncias produzidas e liberadas durante o processo inflamatório estão as citocinas inflamatórias (Di Santo, Alonzi *et al.*, 1997).

In vivo, a paradigma atual é que a lesão, inflamação, e / ou células estranhas podem levar a ativação de células T, e as células T produzem citocinas pró-inflamatórias incluindo o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (Singer e Caplan, 2011).

Quando a microglia local é ativada, os monócitos/macrófagos são recrutados para fagocitar o tecido lesado. Estas e outras células reativas produzem citosinas, como o TNF- α , interleucinas e interferom, que mediam a resposta inflamatória e amplificam o dano tecidual (Klusman e Schwab, 1997). Todavia, Bethea (Bethea, 2000) aduz que muitos estudos apontam a inflamação não somente com um efeito neurotóxico, mas também, como fonte de propriedades neuroprotetoras.

O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda, sendo um dos responsáveis pela imunidade inata. E possui diversos efeitos nas respostas celulares, como na diferenciação, proliferação e reatividade celular, apoptose, imunidade e inflamação (Merrill e Zimmerman, 1991; Medana, Hunt *et al.*, 1997; Tzeng e Wu, 1999; Baud e Karin, 2001).

O principal agente bioquímico dessa discussão é o TNF- α que, pode tanto induzir a expressão de ciclogenase-2 (COX-2), o qual potencializa os efeitos deletérios da inflamação (Resnick, Graham *et al.*, 1998), quanto induzir a expressão de outras citosinas, como a interleucina-1 β (IL-1 β), também com ação inflamatória (Brewer, Bethea *et al.*, 1999).

IL-1 β , por exemplo, é uma das formas moleculares de IL-1, produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória. As funções biológicas da IL-1 β são muito similares às do TNF- α e IL-1 β induz a liberação de mediadores secundários na sepse, do mesmo modo que um número de citocinas inflamatórias, metabólitos do ácido araquidônico e óxido nítrico (Ferrero-Miliani, Nielsen *et al.*, 2007).

.Essas moléculas estão entre as mais estudadas citocinas e evidências indicam que ambas podem agir sinergicamente impedindo a proliferação bacilar, mas também podem se tornar lesivas ao organismo, causando lesões cutâneas e neurais, na ausência de fatores regulatórios (Sampaio e Sarno, 1998)

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

A apoptose, porém, não acontece apenas durante a lesão secundária, podendo ser observada dias ou semanas após o trauma inicial e em regiões distantes do local de lesão. Isso ocorre em virtude de que uma onda de apoptoses pode varrer, através dos oligodendrócitos, a região medular lesada, afetando seus segmentos (Beattie, Farooqui *et al.*, 2000).

1.1.5 Tratamento

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

A imunização com peptídeos tem se mostrado uma estratégia em modelos de LM. Estudos recentes também demonstraram que a adição de glutathiona monoetil éster, também tem se mostrado como outra estratégia, para a recuperação motora,

e motrou ter efeitos proterores para tecido e aumento da sobrevivência neuronal após LM (Del Rayo Garrido, Silva-García *et al.*, 2012).

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

A utilização de células tronco, enfoca uma abordagem neuroregenerativa, que tem como objetivo propiciar uma substituição para as células neurais lesadas, na esperança de reverter o dano do tecido nervoso (Kaminski, Costa *et al.*, 2011). Porém nenhuma das terapias descritas acima tem como abordagem a neuroregeneração. E através de estudos com células-tronco busca-se uma nova estratégia de tratamento para compreender seus mecanismos de ação na lesão medular.

1.2 Células-tronco

As CT são células indiferenciadas, capazes de proliferar e de originar outras CT, o que é denominado autoregeneração e células com capacidade de se diferenciar, originando células diferenciadas com capacidade funcional normal (Santos e Soares, 2004).

Elas possuem duas propriedades fundamentais que as distinguem dos demais tipos de células. Em primeiro lugar, elas são células não especializadas que se renovam por longos períodos através da divisão celular. A outra característica é que sob determinadas condições fisiológicas ou experimentais, elas podem ser induzidas a transformar-se em células com funções específicas, tais como as células miocárdicas ou as células produtoras de insulina do pâncreas (Souza e Elias, 2005)

A outra capacidade fundamental da CT é a auto-replicação, que significa que elas podem gerar cópias idênticas delas mesmas. Estas propriedades únicas das CT fazem com que os pesquisadores busquem nelas a possibilidade de encontrar a cura para muitas doenças, através da substituição dos tecidos danificados (Costa-Ferro, Souza *et al.*, 2012).

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

As CT podem ser classificadas em embrionárias e somáticas ou “adultas”. As CT embrionárias são consideradas totipotentes, pois têm a capacidade de originar células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma. Já as CT adultas ou somáticas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados. Essas células são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (Kaji e Leiden, 2001).

Já as células-tronco da medula óssea (CTMO) são particularmente atraentes porque elas podem ser obtidas facilmente e serem utilizados para transplantes autólogos e alogênicos. As técnicas descritas podem ser facilmente realizadas nos pacientes, acelerando assim a aplicação clínica de terapias com CT (Bakshi, Barshinger *et al.*, 2006). São facilmente trabalhadas em laboratório, podendo ser expandidas *in vitro* rapidamente e já são utilizadas por várias décadas em doenças como a Leucemia (Boido, Rupa *et al.*, 2009).

1.2.1 Células-tronco nas lesões de medula espinhal

O ambiente e perda de conexões axonais após a lesão medular apresentam muitos obstáculos para regenerar o tecido lesado. A terapia celular proporciona um

meio de restaurar as células perdidas na lesão e poder promover a recuperação funcional após lesões. Uma grande variedade de células têm sido investigadas, para determinar as vantagens e desvantagens de cada tipo de célula (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008)

.As CT representam uma nova abordagem terapêutica para LM, permitindo melhores funções motoras e sensoriais em modelos animais. O principal objetivo desta terapia é a substituição de neurônios e células gliais que sofreram morte celular logo após a lesão. As CT são capazes de promover a remielinização por oligodendroglia substituição de células, para produzir factores tráficos que reforcem o crescimento de neurites, o alongamento axonal (Volarevic, Erceg *et al.*, 2012).

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

Muitas variáveis precisam ser investigadas para esclarecimento, como o tipo de células-tronco que proporcionam melhor eficácia e o número de células a ser aplicado (Schultz, 2005; Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008).

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- 1- Verificar o potencial terapêutico das células mononucleares da medula óssea (CMMO) em modelo experimental de lesão medular quanto ao número de aplicações e seu efeito sobre a inflamação no local da lesão, quando administradas pela via subaracnóidea lombar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2- Verificar se existe diferença na recuperação motora com a utilização das CMMO comparando o grupo de 3 aplicações com o grupo de 5 aplicações de CMMO e comparando os mesmos com seus respectivos grupos controle;
- 3- Avaliar se a utilização das CMMO exerce algum efeito sobre a inflamação analisando a expressão das citocinas IL-1B e TNF- α no local da lesão.
- 4- Verificar após o transplante de CMMO a presença destas células na região medular lesada nos grupos com 3 e 5 aplicações.

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Animais

Durante este estudo foram utilizadas 40 ratas fêmeas da raça Wistar com 60 dias de idade e peso de aproximadamente 300 g para a realização da lesão medular e o tratamento com CMMO. Para a doação de CMMO foram utilizados 10 ratos machos, os quais possuíam origem e características semelhantes das ratas. Todos os animais eram provenientes do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante os experimentos as ratas foram mantidas no vivário do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob iluminação e temperatura controladas, ciclo claro-escuro 12 h e temperatura em torno de 24° C, e receberam ração e água *ad libitum*.

3.1.1 Aspectos éticos

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

3.2 Modelo experimental de lesão

O modelo escolhido para lesão foi o de compressão por clipe de aneurisma, em função da semelhança de seu mecanismo de lesão, o de compressão da medula espinhal, com a realidade dos traumas clínicos (Rivlin e Tator, 1978; Onifer, Rabchevsky *et al.*, 2007).

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

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

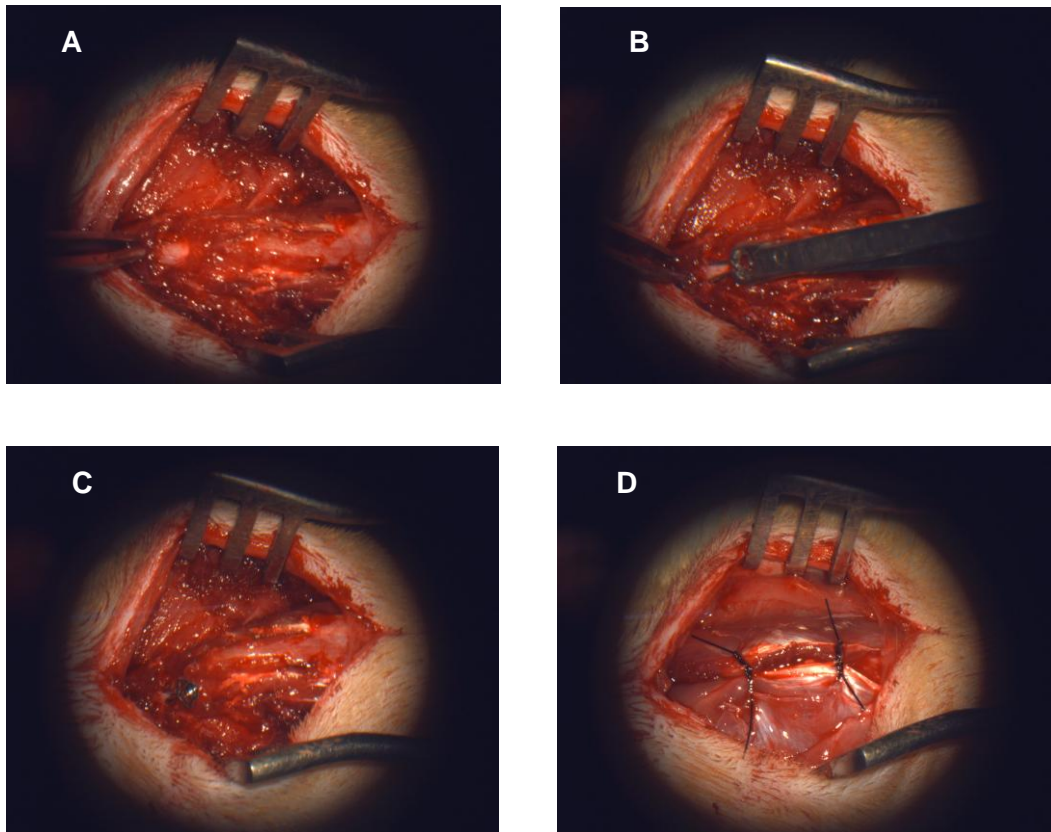


Figura 1 - Procedimento cirúrgico do modelo de lesão. A, exposição da medula espinal, B, colocação das hastes abertas do clipe, C, fechamento das hastes e compressão da medula espinal, D, sutura do primeiro plano, musculatura paravertebral.

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

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

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

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

3.3 Obtenção das células mononucleares da medula óssea

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

3.4 Preparação das células para transplante

Foram definidas alíquotas de células mononucleares para infusão no espaço subaracnóideo. A alíquota para infusão no espaço subaracnóideo teve um volume de 40 µL contendo 10^6 células mononucleares, as quais foram administradas por punção lombar.

3.5 Via de entrega das células mononucleares

As células foram administradas através da via subaracnoidea (VS). Para o transplante das CMMO os animais foram novamente anestesiados com xilasina a 2% e ketamina a 10% e receberam cuidados como aquecimento e analgesia subcutânea com tramadol.

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

3.6 Delineamento experimental

Este estudo contou com 40 ratas fêmeas da raça Wistar, com 60 dias de idade e peso de aproximadamente 300 g. Para lesionar a medula espinhal dos animais foi utilizado o modelo de lesão medular por compressão com clipe de aneurisma (Bakshi, Hunter *et al.*, 2004; Neuhuber, Barshinger *et al.*, 2008), já estabelecido no laboratório de neurociências (Figura 2).

Os animais foram submetidos a lesão medular na altura de T8-T9 e posteriormente divididos em 4 grupos, com 10 ratas em cada. No primeiro grupo (CMMO3), as CMMO foram transplantadas no espaço subaracnóideo no intervalo de 48 h, 9 e 16 dias após a lesão medular, totalizando 3 aplicações. O segundo grupo (SS3) foi controle deste primeiro, no qual os procedimentos foram os mesmos, exceto pelo fato de que foi transplantada solução salina (SS). No terceiro grupo (CMMO5), as CMMO foram transplantadas no espaço subaracnóideo no intervalo de

48 h, 9, 16, 23 e 30 dias após a lesão medular, totalizando 5 aplicações. O quarto grupo (SS5) foi controle deste terceiro, no qual os procedimentos foram os mesmos, exceto pelo fato de que foi transplantada solução salina (Figura 2).

O dano à medula espinhal normalmente ocorre durante as primeiras horas após o trauma. Respostas inflamatórias de glia, por exemplo, iniciam de 5 a 20 minutos posteriores ao traumatismo e finalizam cerca de 2 a 3 semanas após este (Stichel e Müller, 1998; Mcdonald e Sadowsky, 2002b). Com o intuito de frear a ação dessas respostas, o primeiro transplante de células foi realizado 48hs após lesão.

A função motora dos animais foi avaliada semanalmente durante o período de 35 dias após a lesão medular. Passado esse período, os animais foram eutanasiados, com uma *overdose* de anestésicos de quetamina e xilazina, utilizando a via peritoneal. A medula espinhal foi removida, e processada para estudo imunohistoquímico das citocinas IL-1 β e TNF- α , do local da lesão e por PCR.

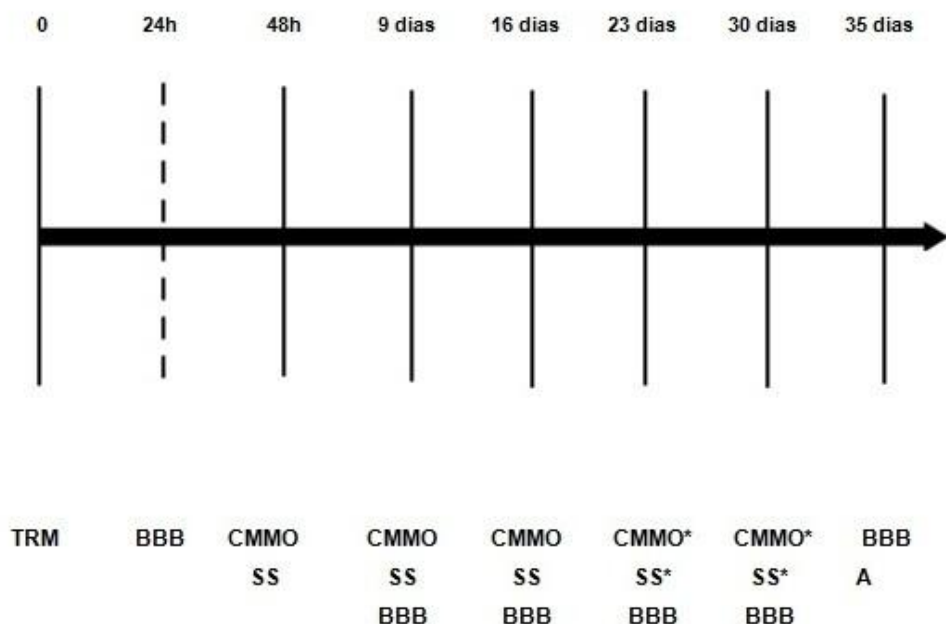


Figura 2

Figura 2 – Delineamento experimental. LM: Lesão Medular, CMMO: Células-tronco da Medula Óssea, SS: Solução Salina, BBB: Escala de avaliação funcional BBB, A: Retirada da medula para avaliação imunohistoquímica e PCR. Linha tracejada representativa da avaliação BBB para exclusão dos animais. * no 23º e 30º dia foram transplantadas CMMO e SS somente nos grupos que contemplavam total de 5 aplicações.

Inicialmente, todas as ratas que possuíam seqüelas motoras após a cirurgia foram incluídas no estudo. Passados 24 h e 48 h após a lesão foi realizado BBB e na presença de BBB com pontuação maior que 3, a rata foi excluída.

3.7 Avaliação funcional

A função motora dos animais foi avaliada semanalmente através da escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) (Basso, Beattie *et al.*, 1995) (escala BBB, Anexo 1), iniciando 48 h após a lesão até 37 dias após. A escala BBB gradua os movimentos das articulações do quadril, joelho e tornozelo, posição do tronco, rabo e patas traseiras. A partir de observações da movimentação do animal, são atribuídos pontos de zero a 21, sendo que o valor de zero, corresponde à ausência total de movimentos, e 21 à presença de movimento normal. Os valores de zero a 7 avaliam os movimentos primários das articulações do quadril, joelho e tornozelo; os de 8 a 13 analisam a colocação e a coordenação das patas traseiras e finalmente, pontuações de 14 a 21 pontos definem o grau da estabilidade de tronco, a posição da cauda e a colocação das patas. Os animais foram filmados para maior confiabilidade, pois a escala apresenta um número elevado de escores e a diferença dos movimentos, entre as ratas, muitas vezes era sutil (Figura 3) (Barros Filho e Molina, 2008). As filmagens foram analisadas por dois avaliadores sem conhecimento do grupo a ser avaliado, ou seja, sem conhecimento do tratamento aplicado. No caso de diferenças ou dúvidas do valor do BBB entre os avaliadores, as filmagens eram revisadas, sendo definido seu valor final.



Figura 3 - Local de avaliação motora pela escala de B.B.B.

3.8 Imuno-histoquímica

A expressão das citocinas Il-10 e TNF- α , foi avaliada por imuno-histoquímica. Após a eutanásia, os animais foram dissecados, sendo coletado o tecido da porção torácica da medula espinhal (T7-T9), com 1cm de tecido normal em cada extremidade. Cortes teciduais com espessura de 5 μ m foram montados sobre lâminas preparadas com solução de APTS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich) a 5 %, em acetona PA, sendo mantidas em estufa (50 °C) durante 1 h, para fixação dos cortes. Após fixação, os cortes foram desparafinizados em xilol e rehidratados por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90 %, 80 % e 70 %). Com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio 1,5 % e metanol absoluto (v/v), por 20 minutos, com posterior lavagem com água destilada. Previamente à incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi utilizada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820

ml de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95 – 98 °C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos em temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, as mesmas foram submersas em PBS.

A imunodeteção foi realizada utilizando os seguintes anticorpos apropriados: rabbit Anti-IL-1B e anti-TNF-a (Abcam). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida (2 – 8 °C), durante 12 – 16 horas. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS em temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-Rabbit (abcam), em câmara úmida, durante 1 h, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com PBS por 5 minutos, em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial (Dako Cytomation), através de uma solução cromógena contendo 0,03 % de 3,3'-diaminobenzidina (3,3,4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride), previamente diluída em tampão imidazol (pH 7,2) e peróxido de hidrogênio a 0,3 %. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, 80 %, 90 % e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Entellan (Merck, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo na ausência do anticorpo primário. Os resultados foram obtidos através de microscópio óptico (Nikon Eclipse 50i) e câmera digital (DS-5M-L1; Nikon, NY, USA), acoplados. As imagens digitalizadas foram transferidas para um computador e a intensidade de marcação foi determinada através do programa NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, EUA).

3.9 Detecção das CMMOs por meio da amplificação de uma parte de um gene do cromossoma Y pela técnica de PCR

Como a presença do cromossomo Y serve de indicativo de célula-tronco transplantada do animal doador (doador = macho, receptora = fêmea) e não de células residentes do animal receptor, utilizamos iniciadores (*primers*) complementares à seqüência de DNA correspondente a uma região específica do cromossomo Y. Foram avaliadas amostras de dois grupos tratados com CMMO, com 3 aplicações e com 5 aplicações de células.

Das 40 ratas que foram submetidas ao modelo de lesão, (20 tratadas com CMMO e 20 grupo controle com SS), destas, 10 receberam 3 transplantes de CMMO 48h, 9 e 16 dias após lesão, as outras 10, receberam cinco transplantes de CMMO, 48h, 9, 16, 23 e 30 dias após lesão por PL. No 37º dia após a lesão, as ratas foram eutanasiadas. Os animais então tiveram suas colunas vertebrais dissecadas, para posterior remoção das medulas espinhais. As amostras foram brevemente reservadas em freezer a -20° C até o início do preparo das reações para a PCR.

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

Para avaliação da migração e presença das células mononucleares transplantadas na região lesada da medula espinhal, utilizamos a técnica da PCR através da análise por eletroforese em gel de agarose. (Gibbs, 1990).

A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-200/MJ Research) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direto 5'-tggagaattctgaggaggaga-3' e reverso 5'attcacaagctgacctcagttg-3' complementares à seqüência de DNA

correspondente a uma região específica do cromossomo Y, gerando um produto de PCR de 524 pb, e uma nova amplificação utilizando o *primer* direto 5'-cagagcccagggtgctcctgctg-3' e reverso 5'-ctcctccattttagatctgcgttc-3' gerando um produto de PCR de 324 pb, caracterizando a técnica de Nested-PCR

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

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

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

3.10 Análise estatística

Para análise dos dados obtidos no teste de B.B.B. e imuno-histoquímica utilizou-se a análise de variância de duas vias com medidas repetidas (ANOVA) seguida de teste de Tukey. Valores com $P < 0,05$ foram considerados

estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do software estatístico *GraphPad Prism 4*.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da função motora (escala BBB)

Os grupos transplantados com 3 e 5 aplicações de CMMO demonstraram diferença significativa nos escores motores ao final dos 37 dias de seguimento, se comparados com seus respectivos grupos controles (Figura 4).

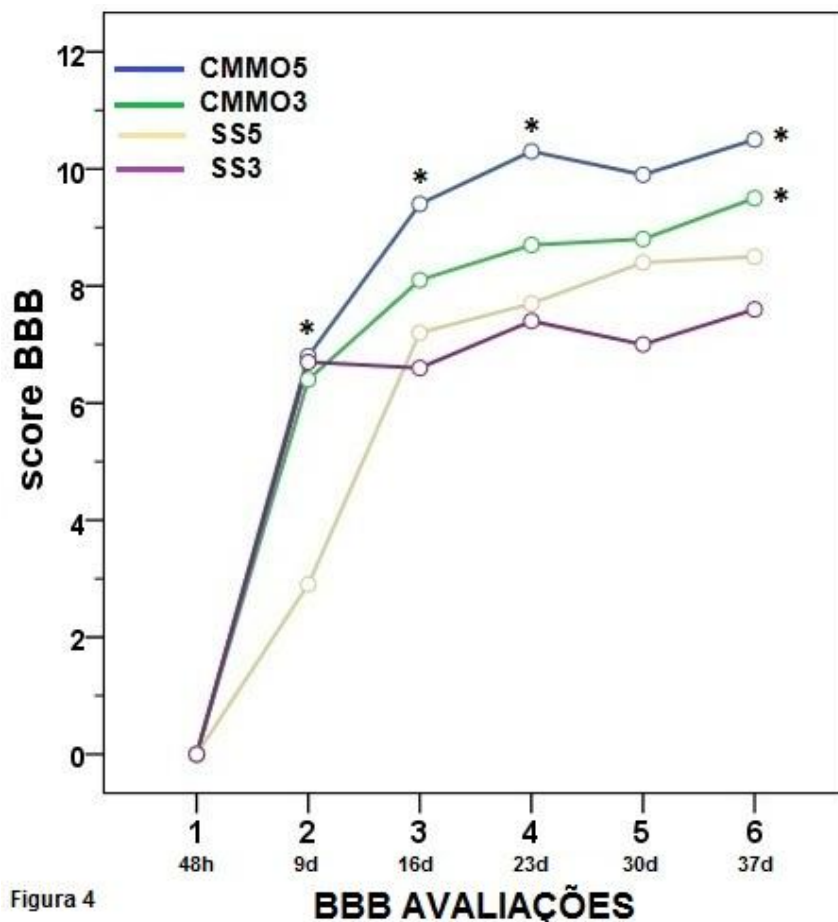


Figura - 4: Gráfico de avaliação motora dos grupos CMMO3 e CMMO5 com seus controles SS3 e SS5. O tratamento com 5 aplicações, CMMO5, melhora o desempenho motor de ratas com lesão de medula espinhal nos momentos: BBB2, BBB3, BBB4 e BBB6. * $P < 0,05$. O grupo CMMO3 melhora o desempenho motor ao final do tratamento, BBB6, quando comparado com seu controle SS3. * $P < 0,05$. O gráfico expressa os escores médios em seis momentos (48h, 9, 16, 23, 30 e 37 dias) de avaliação motora pela escala de BBB, subseqüentes ao modelo de lesão medular e ao transplante de CMMO ou injeção de solução salina por punção lombar. Teste de Tukey após ANOVA de duas vias com medidas repetidas, $n=10$ por grupo.

Foi observada diferença estatística no grupo CMMO5 e seu controle no BBB2, 9 dias, BBB3, 16 dias, BBB4, 23 dias e BBB6, 37 dias. Não houve diferença estatística entre CMMO3 e CMMO5, ou seja, tanto o grupo com 3 aplicações e o grupo com 5 aplicações tiveram melhora semelhante no desempenho motor. No escore final da função motora, observado no BBB6, os dois grupos, CMMO3 e CMMO5, apresentaram diferença estatística quando comparados com seus controles (Figura 5). Os grupos controles, SS3 e SS5, não apresentaram diferença estatística entre si.

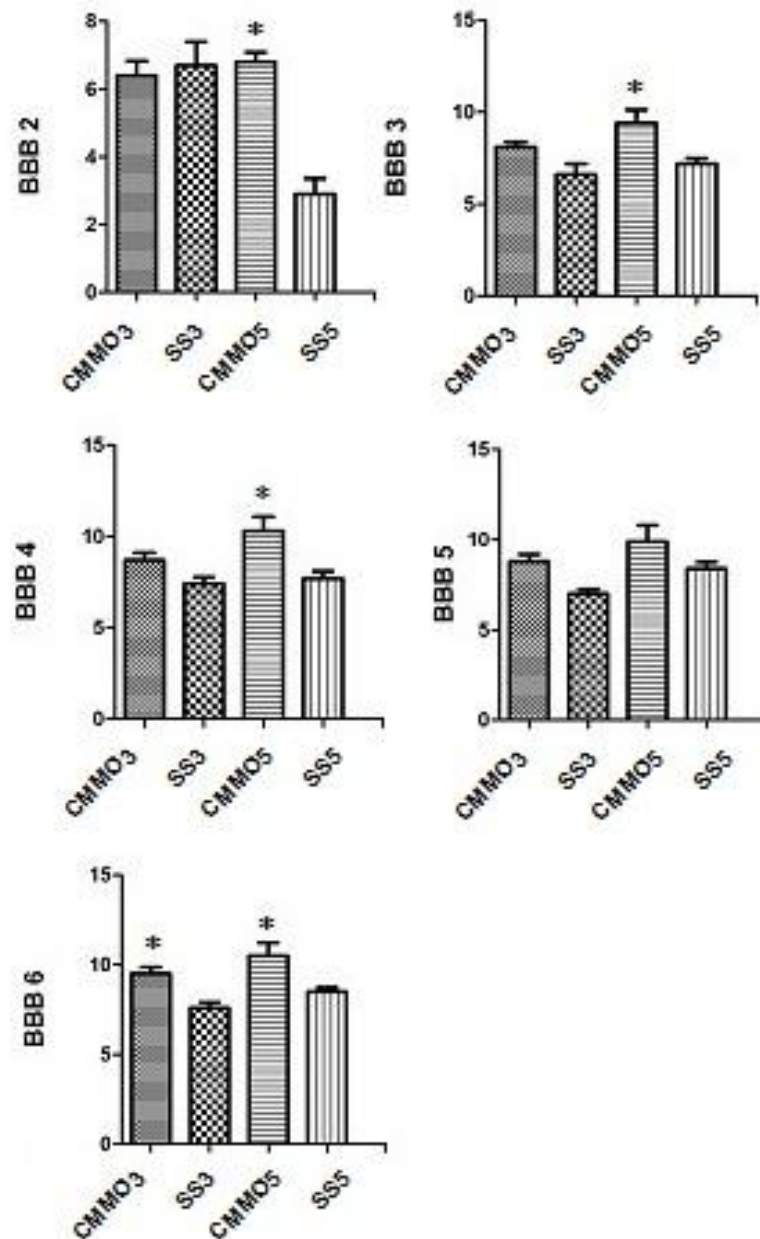


Figura 5: Gráfico expressa os escores das avaliações motoras em diferentes tempos, BBB2, BBB3, BBB4, BBB5 e BBB6. O tratamento com cinco infusões (CMMO5) de CMMO apresenta diferença estatística no desempenho motor no BBB2, BBB3, BBB4 e BBB6 quando comparado com seu controle (SS5). Tanto o tratamento com 3 e 5 infusões apresentam diferença estatística no desempenho motor no BBB6 quando comparados com seus controles SS3 e SS5, *CMMO3 $P < 0,002$ e *CMMO5 $P < 0,001$. Teste de Tukey após ANOVA de duas vias com medidas repetidas, $n=10$ por grupo.

4.2 Análise imuno-histoquímica

Não houve diferença estatística do número de citocinas inflamatórias, IL-1 β e TNF- α entre os grupos tratados com CMMO e seus respectivos controles (figura 6, 7 e 8).

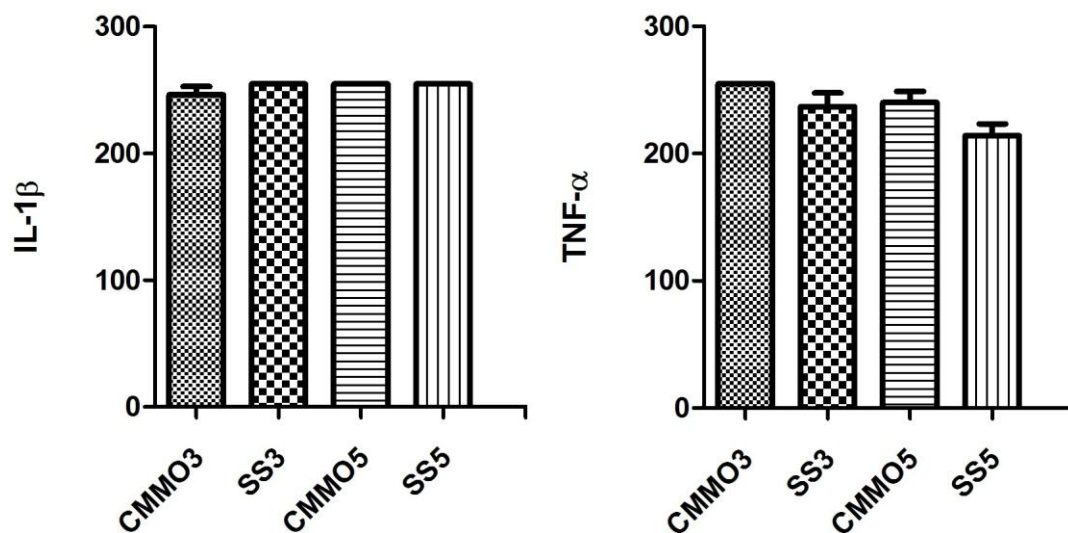


Figura 6

Figura - 6: Dados das análises imuno-histoquímicas das citocinas IL-1 β e TNF- α (A e B), não há diferença estatística no processo inflamatório no local da lesão entre os grupos tratados com CMMO e os seus controles que receberam SS (Teste de Tukey após ANOVA de medidas repetidas).

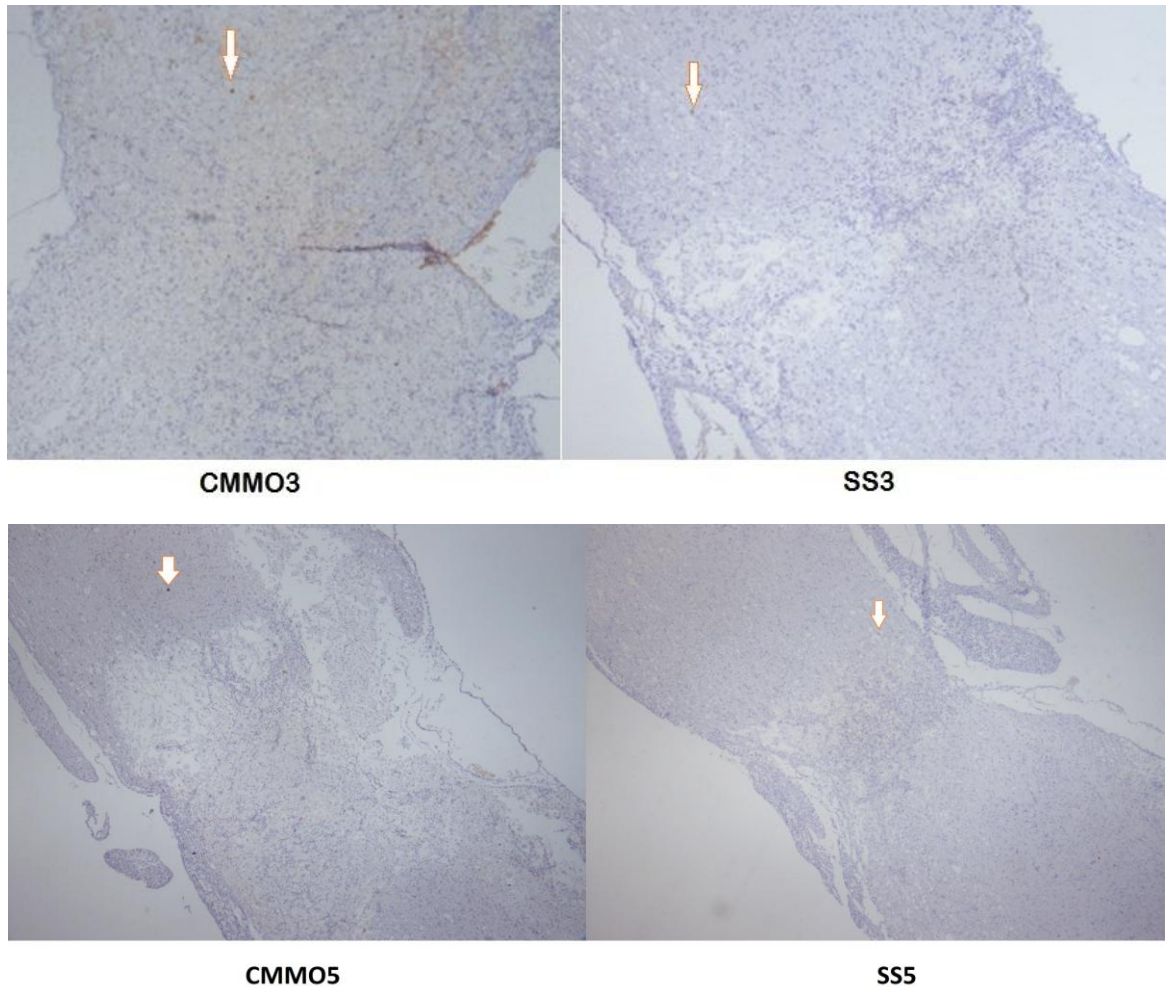
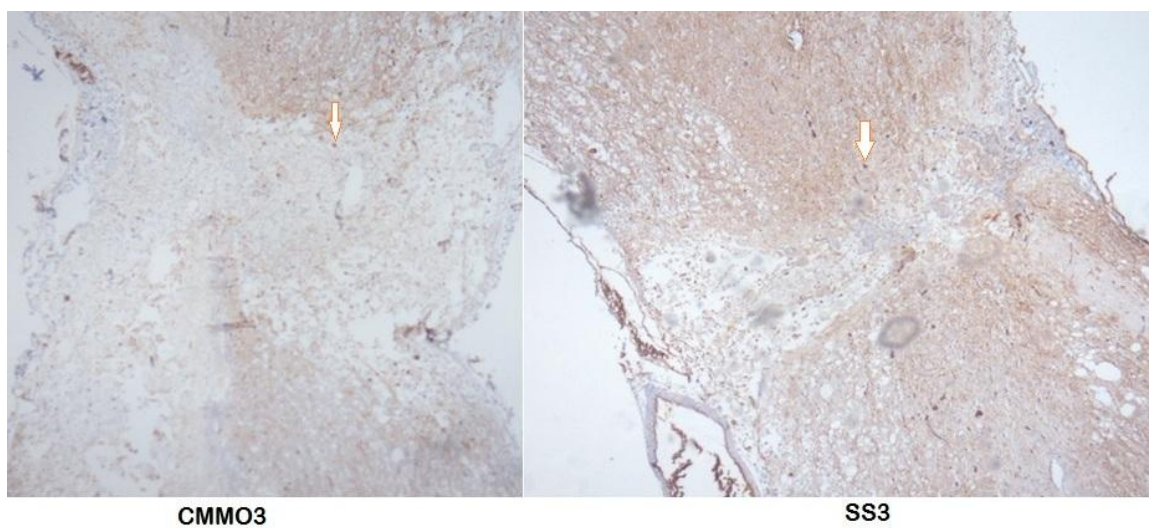


Figura – 7: Grupos CMMO3 e CMMO5 e salina SS3 e SS5. Imagens digitalizadas da imunohistoquímica da região medular lesada, mostrando a expressão da citocina IL-1 β (setas indicando pontos marrons no tecido). O grupos de CMMO não apresentaram diferença estatística na expressão de IL-1 β . Ampliação, $\times 400$



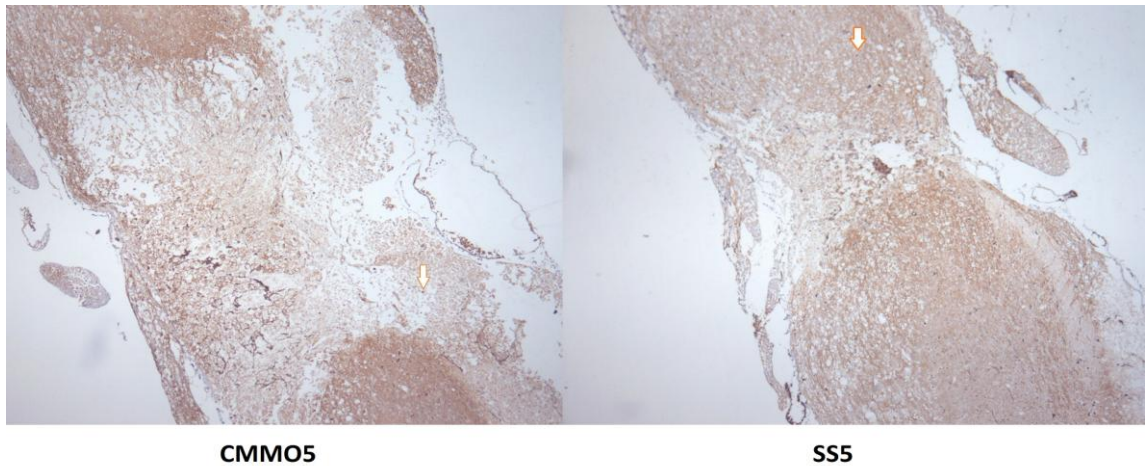


Figura – 8: Grupos CMMO3 e CMMO5 e salina SS3 e SS5. Imagens digitalizadas da imunohistoquímica da região medular lesada, mostrando a expressão da citocina TNF- α (setas indicando pontos marrons no tecido). O grupo CMMO3 não apresentou diferença estatística na expressão de TNF- α . Ampliação, $\times 400$.

4.3 Presença de CMMO na região medular lesada após transplantes

Das seis amostras analisadas para presença de CMMO pela técnica de PCR, nenhuma apresentou positividade para a banda de 342 pb, referente a seqüência específica do cromossomo Y, após a segunda amplificação do ensaio Nested-PCR (Figura 9).

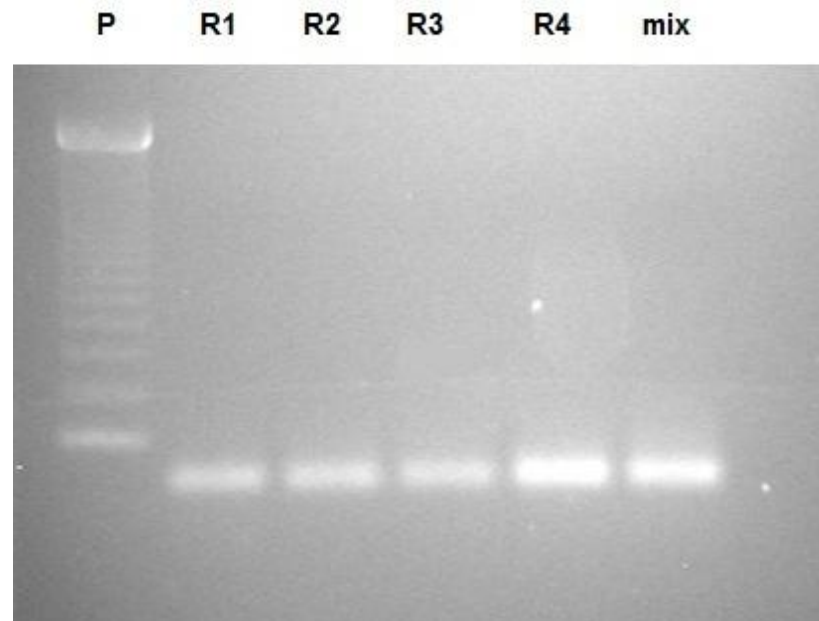


Figura - 9: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para uma sequência específica do cromossoma Y de ratos. M: marcador de peso molecular (100 pb); R1 e R2: ratas com 3 transplantes (negativo); R3 e R4: ratas com 5 transplantes (negativo); mix: controle da reação (sem DNA).

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi possível verificar a melhora motora nos grupos tratados com CMMO, entretanto ao verificar a presença destas células para o local da lesão não puderam ser identificadas, assim como a melhora do processo inflamatório no local da lesão.

Em relação aos nossos dados de avaliação motora pelo BBB nos grupos tratados com CMMO, pode-se observar que estes animais obtiveram melhora na função motora quando comparados com seus respectivos controles, demonstrando efetividade da melhora motora através do tratamento com as CT.

A análise do desempenho dos animais, ao longo do tratamento, o desempenho se mostrou mais efetivo no grupo com cinco aplicações de CMMO em comparação com o grupo controle. Porém quando analisado o escore final que os animais obtiveram na escala BBB após os 37 dias de seguimento, ou seja, o desempenho motor final de cada um, tanto o grupo com 3 aplicações de CMMO quanto o grupo com 5 aplicações foram efetivos no tratamento, sem haver diferença estatística entre grupos. Isto nos diz que, na prática parece haver um número ideal de administração de CT, no qual, acima desta quantidade não agrega em melhora clínica até 37 dias.

No estudo realizado por Yazdani e colaboradores (Yazdani, Pedram *et al.*, 2012) demonstrou que houve uma melhora progressiva no desempenho motor dos animais após a lesão medular, ou seja 35 dias, tempo muito aproximado com de nosso estudo que teve acompanhamento durante 37 dias.

Li e colaboradores (Li, Wen *et al.*, 2010) compararam os efeitos do tratamento com células-tronco no desempenho motor, quanto a diferentes números de aplicações (grupos com 1, 2, 3 e 5 aplicações). O estudo demonstrou que na terceira semana após o início do tratamento, houve diferença significativa entre todos os grupos tratados com seus controles. Após 7, 9 e 12 semanas o desempenho motor se demonstrou melhor nos grupos com três e cinco aplicações de células. Este

estudo se assemelha com o nosso, mostrando que os grupos que apresentam melhor desempenho motor ao longo do tratamento, são os que tiveram maior quantidade de aplicações. Se ficou demonstrado no presente estudo que há melhora do desempenho motor tanto com 3 como com 5 aplicações, na perspectiva de futuros estudos clínicos, a escolha de 3 aplicações poderá ser feita pois, além de apresentar uma melhora semelhante se comparado com 5 aplicações no final do estudo, existe o benefício da necessidade de menor quantidade de injeções e da diminuição de custos.

Embora a causa primária possa resultar na morte de neurônios, esta perda neuronal deve-se principalmente a resposta do organismo ao trauma, conhecida como lesão secundária. Ela inicia após o evento traumático, já nos minutos iniciais e sua interrupção pode ser benéfica, pois leva a efeitos locais, como a inflamação, os efeitos vasculares e a excitotoxicidade, que acabam agravando a lesão primária mecânica (Dumont, Okonkwo *et al.*, 2001).

Houve uma relação positiva do tempo de tratamento com uma menor quantidade de aplicações de CMMOs, na recuperação da função motora. Ao longo do tratamento o grupo com 5 aplicações apresentou melhor desempenho, porém o desempenho motor ao final do tratamento, do grupo com 3 aplicações se igualou com o grupo de 5 aplicações. Portanto, as aplicações de células, demonstram uma relação com o tempo para melhorar a função motora dos animais, no início demonstrou-se mais rápida nos animais com maior número de aplicações, mas ao final do tratamento, a melhora da função motora foi demonstrada em ambos grupos.

A capacidade das CT em segregar substâncias, tais como citocinas e fatores tróficos, demonstram que elas podem substituir células perdidas nas regiões de LM, facilitando a regeneração e resgatando parcialmente células danificadas, levando assim a recuperação funcional após a LM (Urdzíkóvá, Jendelová *et al.*, 2006). Através destes efeitos, as células transplantadas induzem plasticidade na medula lesionada, promovendo alongamento axonal, remielinização e formação de sinapses (Ruff, Wilcox *et al.*, 2012).

A análise imuno-histoquímica das citocinas IL-1 β e da TNF- α , não demonstrou diferença no grau de inflamação no local da lesão pós-transplante de CMMO em ambos os grupos tratados quando comparados entre si e com seus grupos controle.

Contrariamente, após o tratamento com scaffolds embebidos em CT foi relatado que o grau de inflamação foi reduzido (Zeng, Zeng *et al.*, 2011). Já em outro estudo, onde analisavam estas mesmas citocinas, observaram que a IL-1 β suprimiu a lesão medular por reduzir as respostas inflamatórias (Sato, Ohtaki *et al.*, 2012). Porém neste estudo as medulas eram analisadas, após 14 dias de acompanhamento dos animais. No grupo CMMO3 e CMMO5 os animais , foram eutanaziados 35 dias após a LM.

Quando a microglia local é ativada, os monócitos/macrófagos são recrutados para fagocitar o tecido lesado. Estas e outras células reativas produzem citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas que mediam a resposta inflamatória e amplificam o dano tecidual (Klusman e Schwab, 1997). O principal agente bioquímico dessa discussão é o TNF- α que, pode tanto induzir a expressão de ciclogenase-2 (COX-2), o qual potencializa os efeitos da inflamação (Resnick, Graham *et al.*, 1998) e também a IL-1 β que normalmente é ativada em situações em que o TNF- α é produzido, estando ambos presentes em processos inflamatórios (Saperstein, Chen *et al.*, 2009).

Através da técnica de PCR pode-se verificar se havia ou não a presença de células no local da lesão pós-transplante. Nenhum animal apresentou positividade para presença de células no local da lesão. No estudo de Bakshi e colaboradores (Bakshi, Barshinger *et al.*, 2006) os autores concluíram que múltiplos transplantes aumentam o potencial de nidação celular na região medular lesada, porém em nosso estudo, nem o grupo com maior quantidade de aplicações não teve presença de células detectadas no local da lesão. Provavelmente isto pode ser decorrente da diferença de tempo entre aplicações e a análise do tecido. As amostras foram retiradas dos animais para análise de PCR no 37º dia após a lesão. No grupo com 3 aplicações o 16º dia foi o último dia de aplicação e a medula foi coletada para análise no 37º dia após a lesão. Já no grupo com 5 aplicações o 30º dia foi realizada a última aplicação e a medula retirada para análise também no 37º dia após a lesão.

Ohta e colaboradores (Ohta, Suzuki *et al.*, 2004), observaram uma melhora da função motora dos ratos e uma integração local das CMMOs transplantadas, sem haver uma diferenciação das células. Os autores concluem que a melhora funcional

não seria resultado da reposição celular, mas sim da secreção de fatores tróficos que induzem a proliferação de CT endógenas.

Os fatores tróficos tem se mostrado promissores no tratamento de várias condições do Sistema Nervoso Central (SNC). Na LM, o principal papel destes é de primeiramente promover a sobrevivência neuronal e mais tarde, crescimento axonal (Zhao, Duan *et al.*, 2002; Rosner, Avalos *et al.*, 2012). Alguns fatores de crescimento têm sido investigados para o tratamento da LM. A maioria dos estudos são com fatores neurotróficos derivados do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)) (Houweling, Van Asseldonk *et al.*, 1998; Liu, Kim *et al.*, 1999; Kwon, Liu *et al.*, 2002). Em estudos com modelos animais de pequeno porte, o BDNF parece melhorar a função motora após a lesão, embora a significância estatística deste efeito desapareça em acompanhamentos posteriores (Mctigue, Horner *et al.*, 1998; Namiki, Kojima *et al.*, 2000). Estes resultados apontam para os efeitos neuroprotectores de BDNF imediatamente após lesão e em conjunto, demonstram que os fatores tróficos, geram neuroproteção imediata após a lesão, desempenhando um papel importante na regeneração neuronal (Rosner, Avalos *et al.*, 2012).

De maneira similar, Koda *et al.* observaram uma melhora na marcha dos animais após o transplante de CMMO na LM, mesmo sem detecção de tempo de diferenciação dessas células (Koda, Okada *et al.*, 2005). Assim, essa vertente sugere que as CMMO quando transplantadas em uma lesão criam uma ambiente mais favorável, limitando o dano e promovendo regeneração via: imunossupressão (Aggarwal e Pittenger, 2005; Noel, Djouad *et al.*, 2007) e expressão de fatores tróficos e citocinas (Song, Kamath *et al.*, 2004)

Com base nas informações supra-relatadas, pode-se verificar que os resultados do presente estudo, referentes à administração de CMMO e melhora do quadro motor, estão em conformidade com a literatura, pois os grupos tratados apresentaram significativa melhora na função motora. Assim, os achados reforçam a hipótese de que múltiplas aplicações de CMMO podem ser uma alternativa para o tratamento da LM.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível avaliar a recuperação da função motora em ratas com lesão medular após múltiplos transplantes de CMMO e a expressão de citocinas inflamatórias, permitindo concluir que:

- 1- Os múltiplos transplantes de CMMOs, 3 e 5 aplicações, proporcionaram melhora da função motora se comparados com o grupo controle, sendo esta mais rápida nos animais que receberam 5 aplicações.
- 2- Os múltiplos transplantes de CMMOs, 3 e 5 aplicações, apresentam uma recuperação motora semelhante ao final do período de observação.
- 3- Não houve diferença na expressão das citocinas inflamatórias Il-1 β e TNF- α em animais tratados com CMMOs e seus respectivos controles.
- 4- Não foram detectadas CMMOs no local da lesão, independente do número de aplicações, ao final do experimento no 37° dia.

PERPECTIVAS FUTURAS

A pesquisa realizada com as diferentes quantidades de aplicações de células, vias de administração celular, adquiridos com a realização deste trabalho, proporcionam que futuros estudos possam aprofundar os conhecimentos a cerca do potencial terapêutico das CT nas LM. Para que isto seja possível, pretende-se futuramente:

1. Utilizar técnicas de imuno-histoquímica para analisar a expressão das citocinas também em outros períodos durante o tratamento e não somente ao término.
2. Avaliar a hipótese de que o efeito das células transplantadas possa ser mediado por fatores tróficos e modificações do microambiente.
3. Analisar efeitos de atividade física, agregando durante o tratamento, para verificar a possibilidade de melhora precoce da atividade motora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-22, Feb 15 2005.

BAKSHI, A. et al. Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 1, p. 55-65, Jan 2006.

_____. Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. **J Neurosurg Spine**, v. 1, n. 3, p. 330-7, Oct 2004.

BAPTISTE, D. C.; FEHLINGS, M. G. Update on the treatment of spinal cord injury. **Prog Brain Res**, v. 161, p. 217-33, 2007.

BAREYRE, F. M. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. **J Neurol Sci**, v. 265, n. 1-2, p. 63-72, Feb 2008.

BARROS FILHO, T. E.; MOLINA, A. E. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in Wistar rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 63, n. 1, p. 103-8, Feb 2008.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, v. 12, n. 1, p. 1-21, Feb 1995.

_____. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. **Exp Neurol**, v. 139, n. 2, p. 244-56, Jun 1996.

BATTAGLINO, R. A. et al. Spinal Cord Injury-Induced Osteoporosis: Pathogenesis and Emerging Therapies. **Curr Osteoporos Rep**, Sep 2012.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 9, p. 372-7, Sep 2001.

BEATTIE, M. S.; FAROOQUI, A. A.; BRESNAHAN, J. C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 17, n. 10, p. 915-25, Oct 2000.

BETHEA, J. R. Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword. **Prog Brain Res**, v. 128, p. 33-42, 2000.

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

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

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

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

BREWER, K. L.; BETHEA, J. R.; YEZIERSKI, R. P. Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 159, n. 2, p. 484-93, Oct 1999.

CHEHRAZI, B. B.; SCREMIN, O.; DECIMA, E. E. Effect of regional spinal cord blood flow and central control in recovery from spinal cord injury. **J Neurosurg**, v. 71, n. 5 Pt 1, p. 747-53, Nov 1989.

COSTA-FERRO, Z. S. et al. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. **Neurobiol Dis**, v. 46, n. 2, p. 302-13, May 2012.

COUTTS, M.; KEIRSTEAD, H. S. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 209, n. 2, p. 368-77, Feb 2008.

DEL RAYO GARRIDO, M. et al. Therapeutic Window for Combination Therapy of A91 Peptide and Glutathione Allows Delayed Treatment After Spinal Cord Injury. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, Oct 2012.

DI SANTO, E. et al. Differential effects of IL-6 on systemic and central production of TNF: a study with IL-6-deficient mice. **Cytokine**, v. 9, n. 5, p. 300-6, May 1997.

DITUNNO, J. F., JR.; FORMAL, C. S. Chronic spinal cord injury. **N Engl J Med**, v. 330, n. 8, p. 550-6, Feb 24 1994.

DUMONT, R. J. et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. **Clin Neuropharmacol**, v. 24, n. 5, p. 254-64, 2001 Sep-Oct 2001.

EFTEKHARPOUR, E.; KARIMI-ABDOLREZAEI, S.; FEHLINGS, M. G. Current status of experimental cell replacement approaches to spinal cord injury. **Neurosurg Focus**, v. 24, n. 3-4, p. E19, 2008.

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

FERRERO-MILIANI, L. et al. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 2, p. 227-35, Feb 2007.

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

GIRALT, M. et al. Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury. **Exp Neurol**, v. 173, n. 1, p. 114-28, Jan 2002.

GULY, H. R. et al. The incidence of neurogenic shock in patients with isolated spinal cord injury in the emergency department. **Resuscitation**, v. 76, n. 1, p. 57-62, Jan 2008.

HOUWELING, D. A. et al. Local application of collagen containing brain-derived neurotrophic factor decreases the loss of function after spinal cord injury in the adult rat. **Neurosci Lett**, v. 251, n. 3, p. 193-6, Jul 1998.

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

JOHNSON, J. E. et al. Brain-derived proteins that rescue spinal motoneurons from cell death in the chick embryo: comparisons with target-derived and recombinant factors. **J Neurobiol**, v. 27, n. 4, p. 573-89, Aug 1995.

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

KAMINSKI, E. **Transplante de células mononucleares da medula óssea em um modelo experimental de lesão da medula espinhal**. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde/Neurociências) - PUCRS. Porto Alegre: 59 p. 2011.

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

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

KWON, B. K. et al. Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3246-51, Mar 2002.

LENEHAN, B. et al. The epidemiology of traumatic spinal cord injury in British Columbia, Canada. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 37, n. 4, p. 321-9, Feb 2012.

LI, H. et al. [Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into spinal cord injury: a comparison of delivery different times]. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, v. 24, n. 2, p. 180-4, Feb 2010.

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

LIU, Y. et al. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. **J Neurosci**, v. 19, n. 11, p. 4370-87, Jun 1999.

MAGNUS, T. et al. Phagocytotic removal of apoptotic, inflammatory lymphocytes in the central nervous system by microglia and its functional implications. **J Neuroimmunol**, v. 130, n. 1-2, p. 1-9, Sep 2002.

MCDONALD, J. W.; SADOWSKY, C. Spinal-cord injury. **Lancet**, v. 359, n. 9304, p. 417-25, Feb 2 2002a.

_____. Spinal-cord injury. **Lancet**, v. 359, n. 9304, p. 417-25, Feb 2002b.

MCTIGUE, D. M. et al. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. **J Neurosci**, v. 18, n. 14, p. 5354-65, Jul 1998.

MEDANA, I. M.; HUNT, N. H.; CHAUDHRI, G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. **Am J Pathol**, v. 150, n. 4, p. 1473-86, Apr 1997.

MERRILL, J. E.; ZIMMERMAN, R. P. Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia is inhibitable by TGF beta. **Glia**, v. 4, n. 3, p. 327-31, 1991.

MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 287-98, Feb 7 1997.

MULCAHEY, M. J. et al. Interrater reliability of the international standards for neurological classification of spinal cord injury in youths with chronic spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 92, n. 8, p. 1264-9, Aug 2011.

NAMIKI, J.; KOJIMA, A.; TATOR, C. H. Effect of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 on functional recovery and regeneration after spinal cord injury in adult rats. **J Neurotrauma**, v. 17, n. 12, p. 1219-31, Dec 2000.

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

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci**, v. 22, n. 8, p. 299-306, Aug 1997.

NOEL, D. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. **Leuk Lymphoma**, v. 48, n. 7, p. 1283-9, Jul 2007.

OHTA, M. et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. **Exp Neurol**, v. 187, n. 2, p. 266-78, Jun 2004.

ONIFER, S. M.; RABCHEVSKY, A. G.; SCHEFF, S. W. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. **ILAR J**, v. 48, n. 4, p. 385-95, 2007.

POPOVICH, P. G.; WEI, P.; STOKES, B. T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. **J Comp Neurol**, v. 377, n. 3, p. 443-64, Jan 20 1997.

RESNICK, D. K. et al. Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 15, n. 12, p. 1005-13, Dec 1998.

RIVLIN, A. S.; TATOR, C. H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. **Surg Neurol**, v. 10, n. 1, p. 38-43, Jul 1978.

ROSNER, J. et al. The potential for cellular therapy combined with growth factors in spinal cord injury. **Stem Cells Int**, v. 2012, p. 826754, 2012.

RUFF, C. A.; WILCOX, J. T.; FEHLINGS, M. G. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 235, n. 1, p. 78-90, May 2012.

SAMPAIO, E.; SARNO, E. **Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy.** : Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 31 1998.

SANTOS, R.; SOARES, M., AC. **Bone marrow cells transplant in the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy.** Salvador. 37 2004.

SANTOS-BENITO, F. F.; MUNOZ-QUILES, C.; RAMON-CUETO, A. Long-term care of paraplegic laboratory mammals. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 3-4, p. 521-36, Mar-Apr 2006.

SAPERSTEIN, S. et al. IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 5, p. 273-84, May 2009.

SATO, A. et al. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 65, 2012.

SCHERMER, C.; HUMPEL, C. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor activates microglia in rat cortex organotypic brain slices. **Neurosci Lett**, v. 328, n. 2, p. 180-4, Aug 2002.

SCHULTZ, S. S. Adult stem cell application in spinal cord injury. **Curr Drug Targets**, v. 6, n. 1, p. 63-73, Feb 2005.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 457-78, Feb 2011.

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

SOUZA, M.; ELIAS, D. Manual de Instrução Programada: Princípios de Hematologia e Hemoterapia. As Células-Tronco e o seu Potencial na Reparação de Órgãos e Tecidos. Rio de Janeiro 2005.

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

TATOR, C. H.; KOYANAGI, I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. **J Neurosurg**, v. 86, n. 3, p. 483-92, Mar 1997.

TZENG, S. F.; WU, J. P. Responses of microglia and neural progenitors to mechanical brain injury. **Neuroreport**, v. 10, n. 11, p. 2287-92, Aug 1999.

URDZÍKOVÁ, L. et al. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 9, p. 1379-91, Sep 2006.

VOLAREVIC, V. et al. Stem cell based therapy for spinal cord injury. **Cell Transplant**, Oct 2012.

WILLERTH, S. M.; SAKIYAMA-ELBERT, S. E. Cell therapy for spinal cord regeneration. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 2, p. 263-76, Jan 14 2008.

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

YAZDANI, S. O. et al. A comparison between neurally induced bone marrow derived mesenchymal stem cells and olfactory ensheathing glial cells to repair spinal cord injuries in rat. **Tissue Cell**, v. 44, n. 4, p. 205-13, Aug 2012.

YOON, S. H. et al. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. **Stem Cells**, v. 25, n. 8, p. 2066-73, Aug 2007.

ZENG, X. et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Three Dimensional Gelatin Sponge Scaffold Attenuate Inflammation, Promote Angiogenesis and Reduce Cavity Formation in Experimental Spinal Cord Injury. **Cell Transplant**, Mar 2011.

ZHAO, L. R. et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. **Exp Neurol**, v. 174, n. 1, p. 11-20, Mar 2002.

ZWIMPFER, T. J.; BERNSTEIN, M. Spinal cord concussion. **J Neurosurg**, v. 72, n. 6, p. 894-900, Jun 1990.

ANEXO I

Dear Dr. Bonatto,

Your submission entitled "LOCOMOTOR IMPROVEMENT AFTER SPINAL CORD INJURY BY MULTIPLE INJECTIONS OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS WITHOUT LOCAL INFLAMMATORY MODULATION" has been received by Spine Journal.

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

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

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Spine

James N. Weinstein
Editor-in-Chief

Loretta Pickett
Managing Editor

Michaela Powell
Assistant Managing Editor

**LOCOMOTOR IMPROVEMENT AFTER SPINAL CORD INJURY BY MULTIPLE
INJECTIONS OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS WITHOUT LOCAL
INFLAMMATORY MODULATION**

Bonato, Francine A.* DC, PT; Falavigna, Asdrubal MD **; DaCosta, Jaderson Costa MD,
PhD *

Author information

* Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Instituto do Cérebro (InsCer). Instituto de Pesquisas Biomédicas. Pontífica Universidade Católica do RS, Porto Alegre, RS, Brasil and ** Faculdade de Medicina, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul RS, Brasil.

Address reprint requests to

Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD.

Instituto do Cérebro (InsCer).

Avenida Ipiranga, 6690, Jardim Botânico, Prédio 63, CEP 90610-000

Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone/Fax: +5551-3320-3250.

e-mail: jcc@pucrs.br

Abstract

Study design. Experimental animal study of spinal cord injury (SCI), using a stem cells (SC) delivery system.

Objective. This study compared the results of treatment groups with 3 and 5 applications of bone marrow mononuclear cells (BMMC) in the subarachnoid space through a lumbar puncture in a rat SCI model. Subsequently, the motor function and inflammatory rate at the site of injury were analyzed.

Summary of background data. Nowadays, the recovery of neurological functions after SCI still relies on the host's neural plasticity and compensatory mechanisms. Unfortunately many of these patients are permanently paralyzed.

Methods. The experiment was done using an animal model of thoracic SCI with aneurysm clip compression. Afterwards these animals were treated with 3 (BMMC3) or 5 (BMMC5) applications of BMMC directly into the subarachnoid space using a lumbar puncture. The control group received saline solution (SS) that was injected at the same time and frequency (SS3 and SS5) used for BMMC delivery. The animals were sequentially evaluated for motor function using the BBB scale for the presence of BMMC in the lesion by PCR, and the local inflammatory rate through interleukin (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF- α) which were analyzed by immunohistochemistry.

Results. The BMMC5 group showed significant differences in motor scores over the entire study when compared with their SS5 control group. At the end of the treatment, there was a similar motor performance when both treatment groups (BMMC3 vs BMMC5) were

analyzed. In either treatment group and their control there was no difference in inflammatory rate. The PCR could not detect the presence of BMMC at the injury site.

Conclusion. Multiple administration of BMMC in the subarachnoid space through lumbar puncture improves locomotion without showing local inflammatory modification.

Keywords: spinal cord injury, bone marrow mononuclear cells, motor function, IL-1 β , TNF- α .

Introduction

Every year more than 10,000 people suffer spinal cord injury (SCI) caused by traffic, sports and other accidents (1-3). Despite the administration of large doses of steroids and other anti-inflammatory drugs, the recovery of neurological functions after SCI relies on the host's neural plasticity and compensatory mechanisms and unfortunately many of these patients are permanently paralyzed (4, 5). The motor dysfunction usually is associated with loss of bladder or bowel control, skin lesions and blood pressure irregularities (4-6).

The injury mechanism is directly related to the treatment that should be proposed and the patient's functional prognosis. During SCI, spinal cord compression and tissue distension were observed which determine axonal disruption and loss or diminished function (6,7). Immediately after this period, neuronal and axonal degeneration were observed, which contribute to the formation of astrocytic scar (7). The treatment proposed in the acute phase of SCI is decompression of the spinal cord and spinal realignment and stabilization in an attempt to prevent ischemia and demyelination of nerve tissue caused by the inflammatory cascade (6, 7).

The local inflammation after injury is crucial for defense and repair of the affected tissue. Among the substances produced and released during the inflammatory process are inflammatory cytokines (8). Interleukin IL-1 β is a cytokine that induces the expression of adhesion molecules and chemokines, facilitating the migration of leukocytes, and is related to the increase of postoperative pain(9-12). The inflammatory lesion and foreign cells may activate the T cells which produce pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor α (TNF- α) (13). TNF- α is the prime mediator of acute inflammatory and cellular responses, such as differentiation, proliferation, reactivity, apoptosis, inflammation and immunity (14-17).

The current studies reporting the therapeutic potential of stem cells (SC) in neuroregeneration of neural networks in the injured area in order to improve the brain plasticity, provide a new therapeutic strategy for patients with SCI (18, 19). The expected mechanism is that the transplantation of SC may replace lost cells to regenerate the damaged spinal cord and provide an environment rich in growth factors that interrupt or reduce the local immune inflammatory degenerative process and scar (18-21).

The therapeutic use of bone marrow mononuclear cells (BMMC) presents the benefits of not creating an ethical or legal problems, they can be readily withdrawn from the patient, decreasing the risk of rejection, and are more easily manipulated in the laboratory compared with the embryonic cells (22). In order to allow a translational indication to the patients, subarachnoid injection using a lumbar puncture (LP) presents the advantages of avoiding further surgery, eliminating the risk of direct injury to the spinal cord. It is also easy to perform re-infusion because of its less invasive nature (23, 24).

In a recent SCI study in an animal treated with BMMC via subarachnoid space through LP, motor performance improvement was reported (25). The present study will

evaluate the capacity of motor recovery after SCI using multiple BMSC injections in the subarachnoid space and also analyze the effects on the inflammatory process.

Materials and Methods

Animals

Forty female Wistar rats (60 days old), weighing approximately 300g, were used to perform the SCI and treatment with BMSC. Eight male rats (60 days old) were used as BMSCs donors for subsequent detection of chromosome Y.

Surgical Procedures

The animals were weighed and anesthetized by intraperitoneal injection with 2% xylazine (0.1 ml/g) and 10% ketamine (0.22 ml/g). The rats were positioned in ventral decubitus and the skin over the thoracic spine was shaved and cleaned using antiseptic solution. The incision site was determined by palpation of the last rib and counting to define the eighth rib. A 3-cm incision at the midline over the dorsal region was performed with removal of paravertebral muscles and locating the vertebral lamina of the eight thoracic vertebrae (T8). A T8 laminectomy was performed carefully under magnification and the dural sac identified. Spinal cord compression was performed using a 6.7 mm clip (Vicca®) with a closing pressure of 50 g/strength during 60 seconds (26). After the injury, the incision was sutured with mononylon 3-0 and the antiseptic solution was applied to the incision. Postoperatively, ceftriaxone (100 mg/kg, i.p.) and tramadol (1.5 mg/kg s.c.) were administered and subcutaneous hydration with 10 ml of 0.9% was given. The Credé maneuver was performed at the end of the procedure to empty the bladder. Postoperative care included: Credé maneuver twice daily, daily inspection

of the skin; pressure ulcer prevention; and fluid restriction during the acute period and at night, to decrease bladder strain. Rats were weighed once a week, and nutrition was limited to 20 grams to avoid weight gain. In case of anorexia, 10 ml of warm normal saline were administered intraperitoneally. Urinary tract infection, manifested by hematuria with pus or cloudy urine, was treated with amoxicillin with clavulanic acid (2 mg/100 g i.p.) (27, 28).

Preparation of Bone Marrow Mononuclear Cells

BMMCs were obtained from male Wistar rats with the Y chromosome used as a reporter of transplanted cells. Bone marrow was extracted from the humerus, femur, and tibia by flushing with 10,000 U of heparin in 50 ml of DPBS. Extracts were centrifuged at $400 \times g$ for 10 minutes. Cell pellets were resuspended with RPMI-1640 and fractionated on a density gradient generated by centrifugation at $400 \times g$ over a Ficoll-Paque solution (Histopaque 11191, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The mononuclear fraction over the Ficoll-Paque layer was collected and washed twice with DPBS. Cell concentrations were determined with a Neubauer-counting chamber with the number of viable cells determined by Trypan Blue exclusion. For the detection of surface antigen, BMMCs were incubated with conjugated antibodies against CD34, CD11b, CD117, CD45, and Sca1. Labeled cells were collected and analyzed using a FACSCalibur cytometer.

Lumbar Puncture and Subarachnoid Space Injection

BMMCs or saline were infused into the subarachnoid space via LP. A volume of 40 μ L containing 10^6 cells was used (23, 29-31). After anesthesia and skin preparation, the lumbar spinous processes of the L6 and S2 were palpated and a 27G needle was introduced into the subarachnoid space with a slight flexion of the animal's body, to facilitate access to the spinal canal. The correct needle positioning in the subarachnoid space was determined by the

contraction of the tail at the time of needle insertion or cerebrospinal fluid leakage. Cell infusion was performed for 1 minute to avoid reflux.

Study design

Forty adult female Wistar rats were used to perform SCI. The animals were divided into four groups of 10 animals each: 2 control groups and 2 groups receiving BMMCs.

On day 1, animals were subjected to spinal cord compression. On day 2 (24 hours later), animals were evaluated using the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) scale to evaluate motor function (32). The exclusion criteria were rats presenting a BBB score more than 3 points 24 h after injury, because the spinal lesion applied in this study should result in severe motor deficits, and rats becoming sick due to urinary infection during the study.

The BMMC3 treatment group was transplanted 3 times into the subarachnoid space 2, 9 and 16 days after SCI and the other therapeutic group BMMC5 was also transplanted into the subarachnoid space but 5 times, at 2, 9, 16, 23 and 30 days after SCI. Each treatment group, BMMC3 and BMMC5, has the respective control group, SS3 and SS5, which performed the saline solution infusion into the subarachnoid space in the same manner.

All animals were given BBB scores 2, 9, 16, 23, 30 and 37 days after SCI. After the last evaluation, they were euthanized and histologic analysis was performed. The experimental protocols used in this study followed international standards for animal testing, and were approved by the Animal Care and Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul –PUCRS (CEUA 11/00269).

Functional assessment

All animals were given BBB scores 2, 9, 16, 23, 30 and 37 days after SCI. The functional outcomes and BBB locomotor scores were recorded using digital video.

First, an evaluator recorded the videos and assigned motor values to the animals. Subsequently, these videos were sent to 2 blinded reviewers, who analyzed the video and given values. A fourth blinded evaluator, analyzed the 3 results, and with different values, the videos were analyzed again and reached a consensus of the final value.

Y-Chromosome detection using Polymerase Chain Reaction (PCR)

We performed PCR analysis in order to identify the presence of transplanted BMMCs in the spinal cords. Six rats were used to analyze the Y-chromosome, 3 from the BMMC3 and 3 from the BMMC5 group. After the last evaluation at 37 days, the rats were euthanized and samples of the spinal cord collected. We used forward primer 5'-direct atggagaattctgaggaggaga-3' and reverse primer 5'-attcacaagctgacctccagttg-3', complementary to the DNA sequence corresponding to a specific region of the Y-chromosome, generating a PCR product of 524 bp. We performed a new direct amplification using the primer 5'-cagagcccaggtgctcctgctg-3' and reverse 5'-ctctccattttagatctgcgttc-3', generating a PCR product of 324 bp, using a nested PCR technique. A positive control sample (Y-chromosome + DNA extracted from a male rat) and a negative control (no Y-chromosome + DNA extracted from a female rat) were assayed with experimental samples in every reaction. Amplified products were detected by gel electrophoresis (agarose 2% containing ethidium bromide) and viewed under ultraviolet light.

Immunohistochemistry

The immunohistochemical analysis identified the presence of the inflammatory cytokines TNF and IL1 β , to check whether the transplantation of BMMC ou showed any

effect on inflammation at the site of injury. The expression of IL-10 and TNF- α , was assessed by immunohistochemistry

On day 37, after evaluation of motor function, animals were euthanized with high doses of 2% xylazine (0.1 ml/g) and 10% ketamine (0.22 ml/g) intraperitoneally. 6 rats were perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). The spine was carefully dissected and the spinal cord was removed. A piece of spinal cord, measuring 1cm, was dissected to perform the histological analysis. The main lesion produced in our study was located at the center of the piece. Tissue sections with a thickness of 5 mm were kept in an oven for 1 hour to fix the cuts. Immunodetection was performed using appropriate antibodies as follows: rabbit anti-IL-1 β , and anti-TNF- α (Abcam). For each reaction a negative control was used in the absence of primary antibody. The results were obtained by optical microscope (Nikon Eclipse 50i) and a digital camera (DS-5M-L1, Nikon, NY, USA) coupled. The scanned images were transferred to a computer and the intensity of staining was determined using the ImageJ 1.36b program NIH (National Institutes of Health, Maryland, USA).

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm standard error of 10 animals per group. The percentages of inhibition were calculated as the mean of inhibitions obtained for each individual experiment. Statistical comparison of the data was performed by Student t test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. P-values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered significant. Statistical analysis was performed with PrismGraph 5.0 software (Graph-Pad Software, San Diego, CA)

Results

Recovery of motor function

The BBB scores results in the group in which 3 injections of BMMC in the subarachnoid space (BMMC3) were performed showed a significant improvement in the last evaluation on day 37 when compared with the saline injection group (SS3). Analysis of variance demonstrated that the BBB had significantly improved in rats treated with 5 applications of BMMC (BMMC5), not only in the last evaluation on day 37, but also in the motor assessment on day 9, 16 and 23 if compared with its control group SS5 (figure 1). Post-hoc analysis indicated that function improved significantly beginning week 2 after transplantation.

When the treatment groups were compared, BMMC3 vs BMMC5, no difference was observed in the motor score in all BBB assessments (figure 1).

Immunohistochemistry

No statistical difference was observed in the percentage of inflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α between the treated groups with BMMC and their corresponding controls (BMMC3 vs SS3 and BMMC5 vs SS5) (Figure 2, 3 and 4).

Migration of donor-derived BMMCs to the site of injury

PCR analysis was performed on 6 spinal cord samples from injured rats transplanted with BMMCs and none was positive for the band of 342 bp, corresponding to the specific sequence of the Y-chromosome after the second amplification (Figure 5).

Discussion

The present study has shown the beneficial effect of multiple BMMC injections into the subarachnoid space to improve motor recovery in animals with SCI.

After the primary traumatic injury directly to the spinal cord there are secondary injuries originated by the body's response to trauma. Both have a similar negative impact on the spinal cord function leading to neuronal death and loss. The secondary events are initiated soon after the SCI and provoke local ill effects, such as inflammation, excitotoxicity and vascular dysfunction, which exacerbate the primary mechanical injury (33). These local effects can be reversed or minimized by the SC therapy and the grade of recovery is related to the number of applications as seen in animals where 5 infusions were performed compared with 3 injections.

Li et al (34) compared motor performance after treatment with one or multiple (2 vs 3 vs 5) injections of SC. The study demonstrated that after 3 weeks of treatment there was a significant difference between the SC groups, independently of the number of doses, and their controls. However, the motor performance was enhanced in the animals that received 3 or 5 injections of SC. In the present study, the multiple injections of BMMC also showed a significant motor recovery after 37 days of SCI.

The SC can promote a more favorable environment at the injury site by replacing the cells and through immunosuppression (35, 36) and expression of growth factors and cytokines (37) which can facilitate the regeneration, neuronal survival, recovery of damaged cells and later axonal growth (22, 38, 39). With these effects, the transplanted cells induce plasticity in the injured spine by promoting axonal elongation, synapse formation and remyelination (40).

The importance of the favorable environment induced by the SC was observed by several authors. Ohta et al. (41), reported an improvement of motor function despite the undifferentiation of the SC and concluded that the functional improvement was not a result of cell replacement, but the secretion of trophic factors that induce proliferation of endogenous

SC. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is one of the common growth factors that was investigated for SCI treatment (42-44). The use of BDNF following injury seems to improve the motor function mainly at the first evaluations (45, 46). These findings suggested that the neuroprotective effects of BDNF occurs immediately after injury and play an important role in neuronal regeneration and survival (39). Similarly, improved walking was reported in animals with SCI after BMNCs transplantation, before the differentiation of these cells was observed (47).

When the local microglia are activated, monocytes and macrophages are recruited to phagocyte the injured tissue. Consequently, these cells produce cytokines, like TNF- α and interleukins, that mediate the inflammatory response and amplify tissue damage (48). The TNF- α can induce the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), which potentiates the effects of inflammation (49). This inflammatory process is further intensified by IL-1 β (50).

Immunohistochemical analysis of IL-1 β and TNF- α showed no difference in the level of inflammation at the site of the lesion after transplantation of BMNC independently of the number of infusions when compared with their control groups. Contrary to our results, there are studies that analyzed IL-1 β and TNF- α and reported an attenuation or suppression of the inflammation after SC treatment (4, 51). In contrast with our study, the spinal cord was analyzed after 14 days of SCI, whereas we performed the analysis 35 days after SCI.

Yazdani et al (52) showed that the motor performance of the animals progressively improved 35 days after the SCI lesion. This was also observed in our study, where the motor recovery began 2 weeks after the SCI and got progressively better up to 37 days of follow-up.

Bakshi et al. (29) reported that multiple transplants increase the potential for cell implantation in the injured spinal region. In our study no SC were detected at the lesion site in any of the treatment groups. This could probably be explained by the time elapsed between the last SC applications and the tissue analysis. Samples were taken on the 37th day after SCI

which was 19 days after the last application in the BMMC3 group and 5 days in the BMMC5 group.

A therapeutic effect of multiple BMMC injections into the subarachnoid space to treat animals with SCI was observed. These beneficial effects occur despite the variance of inflammatory cytokines. No difference was observed in the efficacy between the CMMO3 vs CMMO5 groups. In clinical translation this shows that 3 stem cell injections into the subarachnoid space may be the benchmark to have a therapeutic effect and there is no need for exposure to further LP infusions (52).

Conclusion

The present study showed that 3 or 5 BMMC subarachnoid infusions by LP BMMC provide significant and similar motor recovery at the last evaluation. No difference could be observed when the expression of inflammatory cytokines IL-1 β and TNF was analyzed.

REFERENCES

1. Ackery A, Tator C, Krassioukov A. A global perspective on spinal cord injury epidemiology. *J Neurotrauma*. 2004;21(10):1355-70.
2. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(24 Suppl):S2-12.
3. DeVivo MJ. Causes and costs of spinal cord injury in the United States. *Spinal Cord*. 1997;35(12):809-13.
4. Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, et al. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2012;9:65.
5. Enzmann GU, Benton RL, Talbott JF, Cao Q, Whittemore SR. Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. *J Neurotrauma*. 2006;23(3-4):479-95.
6. Bambakidis NC, Butler J, Horn EM, Wang X, Preul MC, Theodore N, et al. Stem cell biology and its therapeutic applications in the setting of spinal cord injury. *Neurosurg Focus*. 2008;24(3-4):E20.
7. Pan HC, Cheng FC, Lai SZ, Yang DY, Wang YC, Lee MS. Enhanced regeneration in spinal cord injury by concomitant treatment with granulocyte colony-stimulating factor and neuronal stem cells. *J Clin Neurosci*. 2008;15(6):656-64.
8. Di Santo E, Alonzi T, Poli V, Fattori E, Toniatti C, Sironi M, et al. Differential effects of IL-6 on systemic and central production of TNF: a study with IL-6-deficient mice. *Cytokine*. 1997;9(5):300-6.
9. Bilate AM. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de Reumatologia Clínica* 2007. p. 47-51.
10. Oliveira CMBd. Citocinas e Dor. In: Sakata RK, editor. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 2011. p. 255-65.

11. Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH. Cytokines for surgeons. *Am J Surg.* 2002;183(3):268-73.
12. Wolf G, Livshits D, Beilin B, Yirmiya R, Shavit Y. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. *Brain Behav Immun.* 2008;22(7):1072-7.
13. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:457-78.
14. Merrill JE, Zimmerman RP. Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia is inhibitable by TGF beta. *Glia.* 1991;4(3):327-31.
15. Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol.* 1997;150(4):1473-86.
16. Tzeng SF, Wu JP. Responses of microglia and neural progenitors to mechanical brain injury. *Neuroreport.* 1999;10(11):2287-92.
17. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 2001;11(9):372-7.
18. Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, et al. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells.* 2007;25(8):2066-73.
19. Bareyre FM. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. *J Neurol Sci.* 2008;265(1-2):63-72.
20. Giralt M, Penkowa M, Lago N, Molinero A, Hidalgo J. Metallothionein-1+2 protect the CNS after a focal brain injury. *Exp Neurol.* 2002;173(1):114-28.
21. Schermer C, Humpel C. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor activates microglia in rat cortex organotypic brain slices. *Neurosci Lett.* 2002;328(2):180-4.

22. Urdzíkova L, Jendelová P, Glogarová K, Burian M, Hájek M, Syková E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2006;23(9):1379-91.
23. Neuhuber B, Barshinger AL, Paul C, Shumsky JS, Mitsui T, Fischer I. Stem cell delivery by lumbar puncture as a therapeutic alternative to direct injection into injured spinal cord. *J Neurosurg Spine*. 2008;9(4):390-9.
24. Paul C, Samdani AF, Betz RR, Fischer I, Neuhuber B. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(4):328-34.
25. Kaminski E. **Transplante de células mononucleares da medula óssea em um modelo experimental de lesão da medula espinhal**. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde/Neurociências) - PUCRS. Porto Alegre 2011. p. 59.
26. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol*. 1978;10(1):38-43.
27. Liu J, An H, Jiang D, Huang W, Zou H, Meng C, et al. Study of bacterial translocation from gut after paraplegia caused by spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(2):164-9.
28. Santos-Benito FF, Muñoz-Quiles C, Ramón-Cueto A. Long-term care of paraplegic laboratory mammals. *J Neurotrauma*. 2006;23(3-4):521-36.
29. Bakshi A, Hunter C, Swanger S, Lepore A, Fischer I. Minimally invasive delivery of stem cells for spinal cord injury: advantages of the lumbar puncture technique. *J Neurosurg Spine*. 2004;1(3):330-7.
30. Bakshi A, Barshinger AL, Swanger SA, Madhavani V, Shumsky JS, Neuhuber B, et al. Lumbar puncture delivery of bone marrow stromal cells in spinal cord contusion: a novel method for minimally invasive cell transplantation. *J Neurotrauma*. 2006;23(1):55-65.

31. Paul C, Samdani AF, Betz RR, Fischer I, Neuhuber B. Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(4):328-34.
32. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
33. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol*. 2001;24(5):254-64.
34. Li H, Wen Y, Luo Y, Lan X, Wang D, Sun Z, et al. [Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into spinal cord injury: a comparison of delivery different times]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2010;24(2):180-4.
35. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
36. Noël D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(7):1283-9.
37. Song S, Kamath S, Mosquera D, Zigova T, Sanberg P, Vesely DL, et al. Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells. *Exp Neurol*. 2004;185(1):191-7.
38. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002;174(1):11-20.
39. Rosner J, Avalos P, Acosta F, Liu J, Drazin D. The potential for cellular therapy combined with growth factors in spinal cord injury. *Stem Cells Int*. 2012;2012:826754.
40. Ruff CA, Wilcox JT, Fehlings MG. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2012;235(1):78-90.
41. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol*. 2004;187(2):266-78.

42. Houweling DA, van Asseldonk JT, Lankhorst AJ, Hamers FP, Martin D, Bär PR, et al. Local application of collagen containing brain-derived neurotrophic factor decreases the loss of function after spinal cord injury in the adult rat. *Neurosci Lett*. 1998;251(3):193-6.
43. Liu Y, Kim D, Himes BT, Chow SY, Schallert T, Murray M, et al. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J Neurosci*. 1999;19(11):4370-87.
44. Kwon BK, Liu J, Messerer C, Kobayashi NR, McGraw J, Oschipok L, et al. Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):3246-51.
45. McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 1998;18(14):5354-65.
46. Namiki J, Kojima A, Tator CH. Effect of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 on functional recovery and regeneration after spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma*. 2000;17(12):1219-31.
47. Koda M, Okada S, Nakayama T, Koshizuka S, Kamada T, Nishio Y, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport*. 2005;16(16):1763-7.
48. Klusman I, Schwab ME. Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res*. 1997;762(1-2):173-84.
49. Resnick DK, Graham SH, Dixon CE, Marion DW. Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1998;15(12):1005-13.
50. Saperstein S, Chen L, Oakes D, Pryhuber G, Finkelstein J. IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(5):273-84.

51. Zeng X, Zeng YS, Ma YH, Lu LY, Du BL, Zhang W, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Three Dimensional Gelatin Sponge Scaffold Attenuate Inflammation, Promote Angiogenesis and Reduce Cavity Formation in Experimental Spinal Cord Injury. *Cell Transplant*. 2011.
52. Yazdani SO, Pedram M, Hafizi M, Kabiri M, Soleimani M, Dehghan MM, et al. A comparison between neurally induced bone marrow derived mesenchymal stem cells and olfactory ensheathing glial cells to repair spinal cord injuries in rat. *Tissue Cell*. 2012;44(4):205-13.

Figure Legends

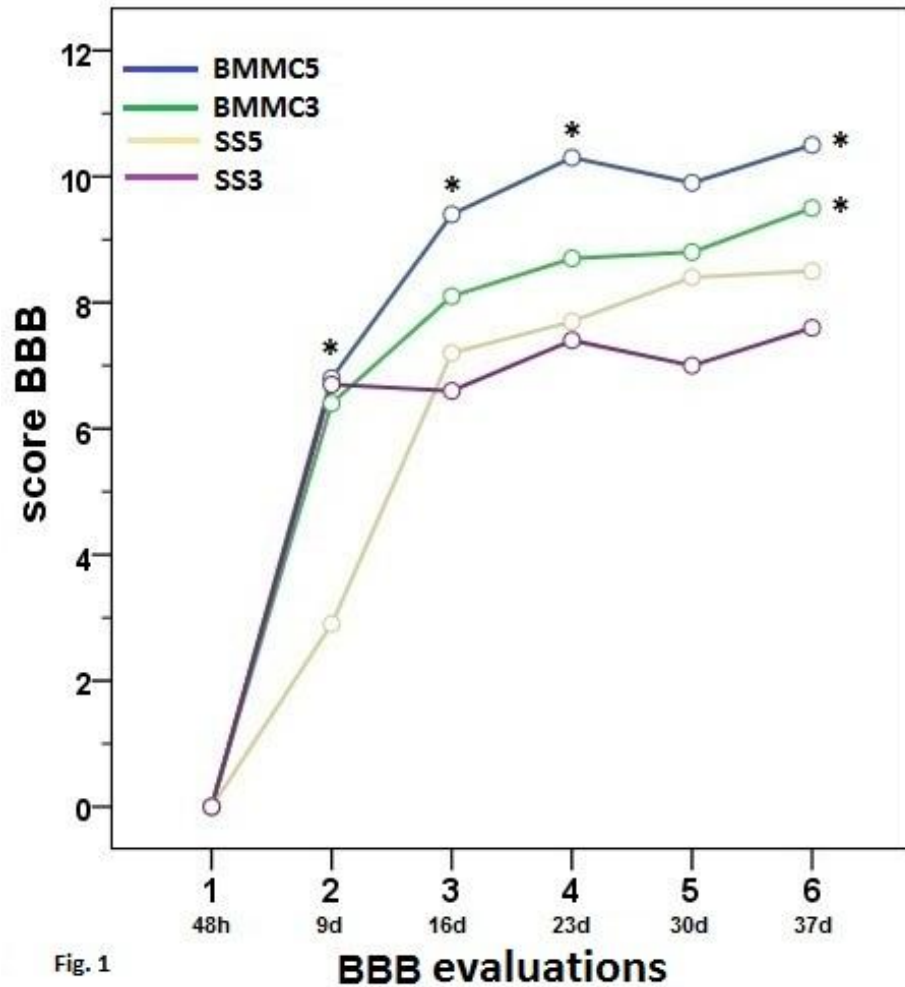


Fig. 1

Figure 1. Graphic of motor evaluation of groups CMMO3 and CMMO5 with their controls SS3 and SS5. Treatment with 5 applications, CMMO5, significantly improves the motor performance after the second BBB evaluation, except for BBB5, when compared with the control group (SS5). The CMMO3 group showed a significant difference from the control group (SS3) only in the last evaluation ($P < 0.002$). The graphic expresses the mean scores of the 6 BBB assessment. Tukey test after two-way ANOVA with repeated measures, $n = 10$ per group

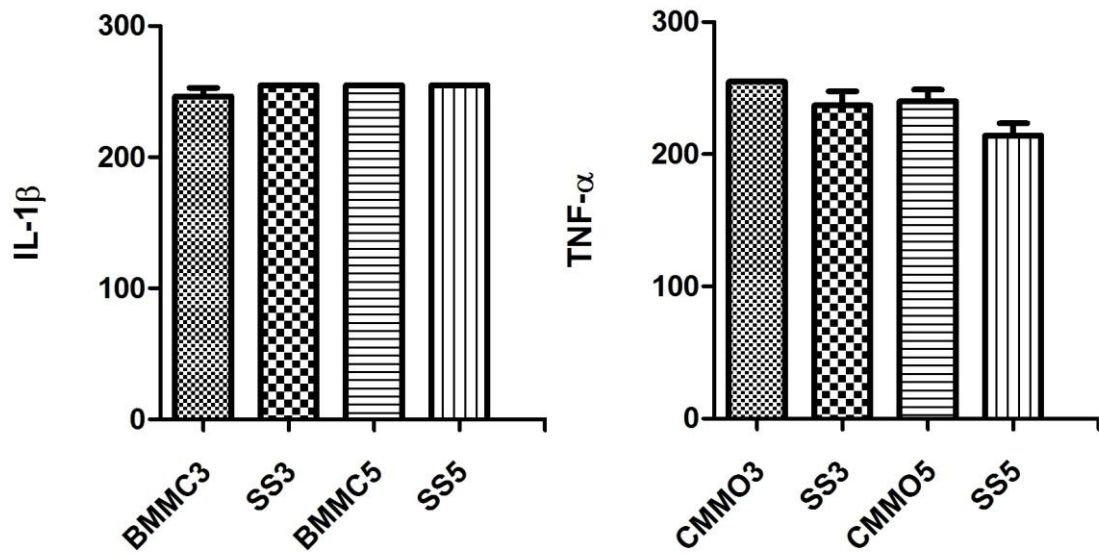


Figure 2: Data immunohistochemical analysis of IL-1 β (A) and TNF- α (B) between the stem cells group and their control showed that there is no statistical difference in the inflammatory process at the site of injury.

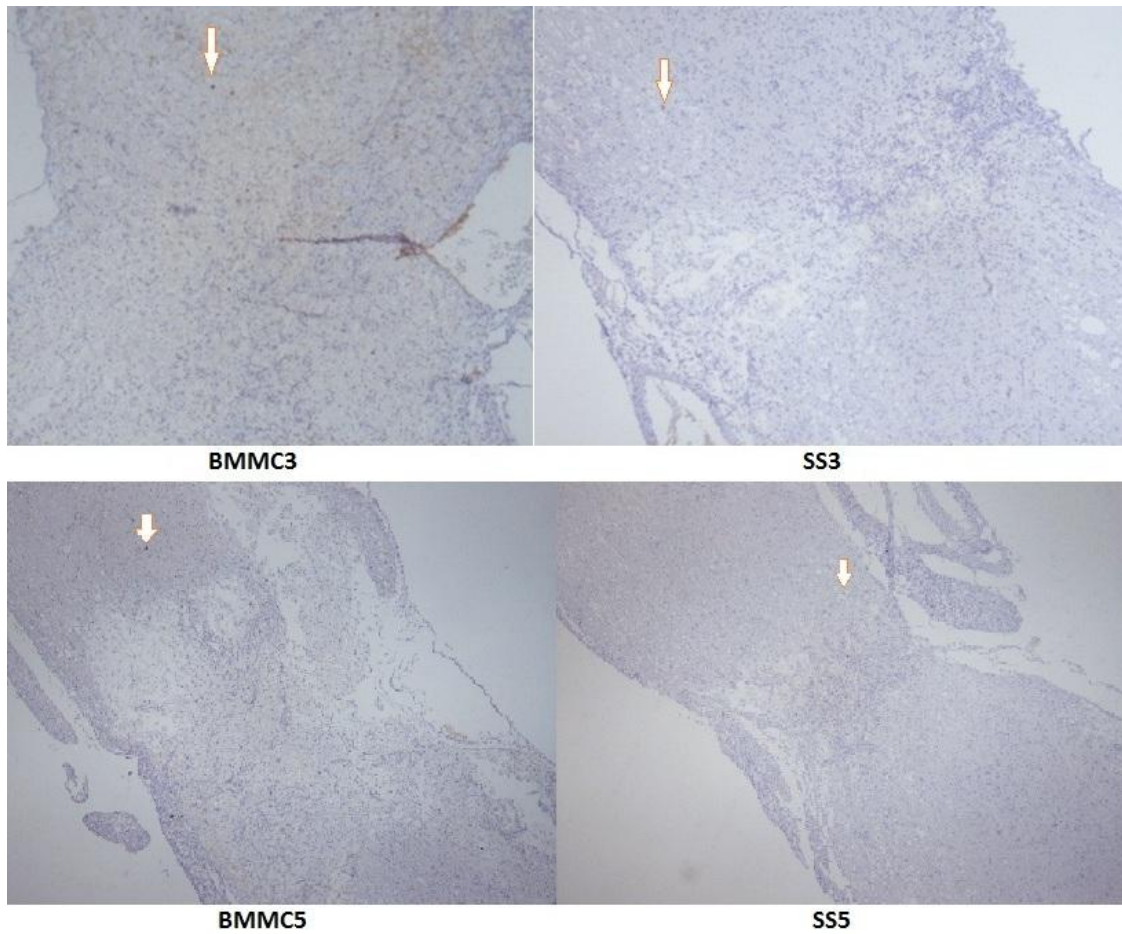


Figure 3. Digitized images of immunohistochemistry of the SCI, showing the expression of the cytokine IL-1 β (arrows indicating brown spots on the tissue). There was no difference between the groups of IL-1 β . expression. Magnification X 400.

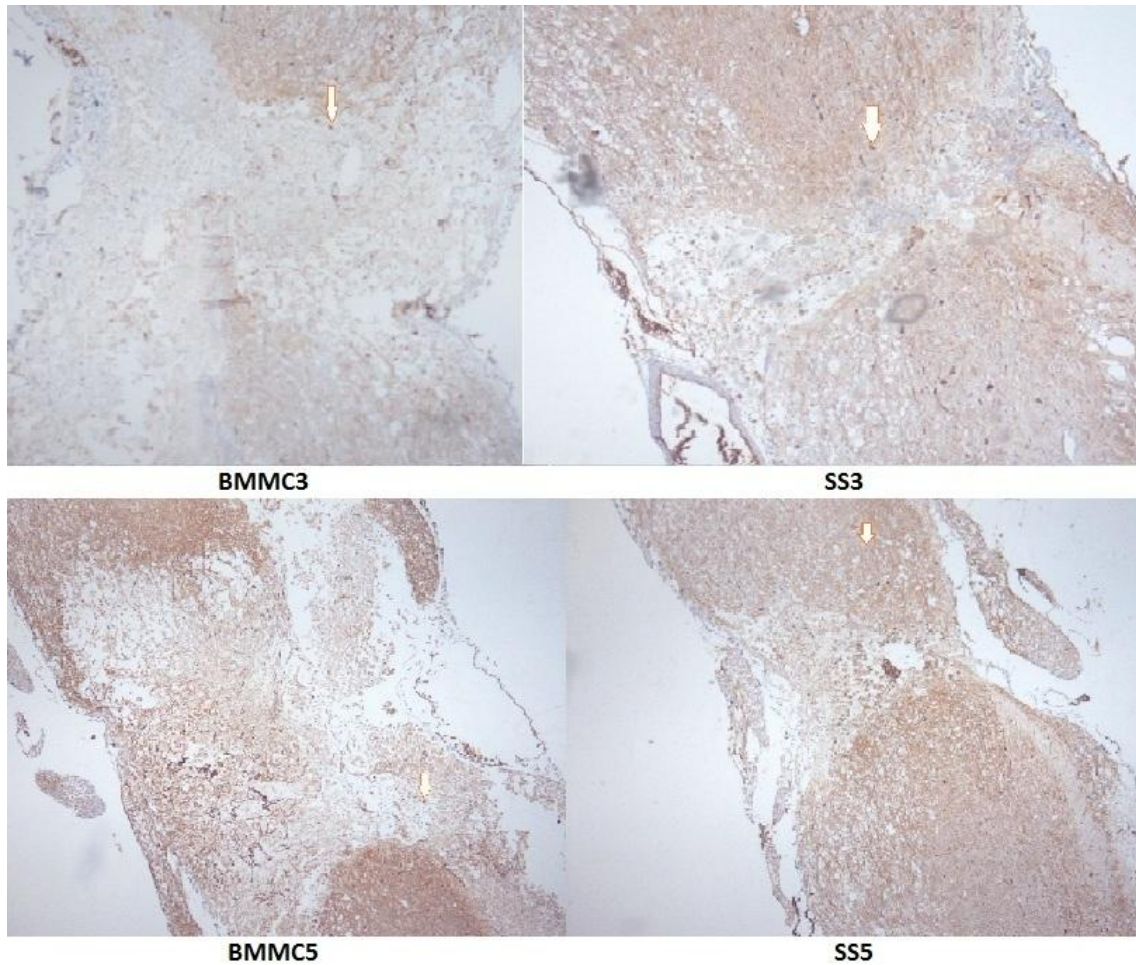


Figure 4. Digitized images of immunohistochemistry of the SCI, showing the expression of the cytokine TNF- α (arrows indicating brown spots on the tissue). There was no difference between the groups of expression of TNF- α . Magnification X 400.

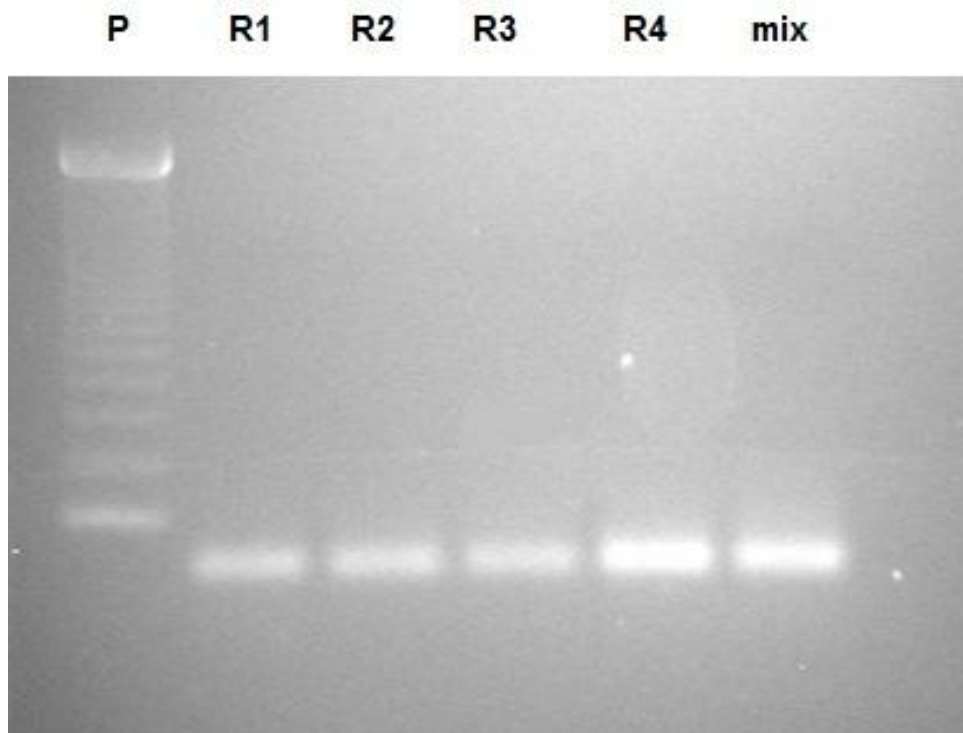


Figure 5. Agarose gel electrophoresis, the PCR products of a specific sequence of the Y chromosome in rats. M: molecular weight marker (100 bp); R1e R2: rats with 3 transplants (negative); R3 and R4 rats with 5 transplants (negative); mix: control reaction (without DNA).