

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

TESE DE DOUTORADO

APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DE
LESÕES RAQUIMEDULARES NATURALMENTE ADQUIRIDAS EM CÃES E EM
GATOS DOMÉSTICOS

EULER MORAES PENHA

Salvador – Bahia – Brasil

2014

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DE
LESÕES RAQUIMEDULARES NATURALMENTE ADQUIRIDAS EM CÃES E EM
GATOS DOMÉSTICOS**

EULER MORAES PENHA

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Milena Botelho Pereira Soares

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, como parte dos requisitos necessários para obtenção de grau de Doutor.

Salvador – Bahia – Brasil

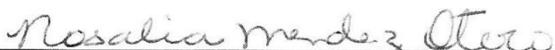
2014

“APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DE LESÕES
RAQUIMEDULARES NATURALMENTE ADQUIRIDAS EM CÃES E EM GATOS
DOMÉSTICOS.”

EULER MORAES PENHA

Folha de Aprovação

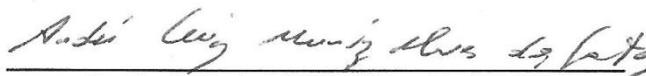
Comissão Examinadora



Dr^a Rosália Mendez-Otero
professora titular
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dr^a Paula Carvalho Lage von Buettner Ristow
Professora Adjunta
Universidade Federal da Bahia



Dr. André Luiz Muniz Alves dos Santos
Professor associado
Hospital Universitário Professor Edgard Santos

FONTES DE FINANCIAMENTO

CNPq

FAPESB

Sonhar um sonho que se sonha só é apenas e tão somente um sonho. Viver e partilhar o sonho, sabendo que o objeto do sonho nunca será igual ao sonhado, e ter no outro a persistência de se manter em uma linha, mesmo que por vezes torta, transforma certamente o sonho em realidade vívida!.

Obrigado Laís e Giovanna por me manterem no rumo certo.

Este trabalho dedico a vocês.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que contribuíram para a realização desta obra:

À minha persistente e paciente orientadora Milena;

À amiga Simone pelas horas de dedicação a projetos e revisões;

Ao sempre amigo e otimista Marcus Vinícius;

Aos colegas, colaboradores, corretores e especialmente meus professores Liu e Ricardinho;

Aos meus colegas de UFBA Stella e Paulo Palis;

Aos alunos da iniciação em especial Cássio e Aninha;

À equipe de fisioterapia Cláudia, Taiana e Faye, a todos os guadiões do gatil Bia, Gilian, Flávia, Illa, Aninha, Daniela, Paloma, Priscila;

Aos colegas de trabalho do LETI e da UFBA;

Aos amigos anesthesiologistas Rodrigo, André e Levi (*in memoriam*);

Aos meus pais, Enock e Irene; Irmãos Helder e Priscila; Minha irmã emprestada Gisele; meus queridos sogros Solange e Ribeiro; meu afilhado e sobrinho Daví, parentes e amigos pelas palavras de incentivo;

Às instituições de fomento à pesquisa.

PENHA, Euler Moraes. Aplicação de células-tronco mesenquimais no tratamento de lesões raquimedulares naturalmente adquiridas em cães e em gatos domésticos. 92f. il. Tese (doutorado). – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

Mecanismos de lesão e suas consequências decorrentes de injúria da medula espinhal (IME) envolvem morte neuronal tanto por necrose quanto por apoptose. Sabendo-se que a regeneração do sistema nervoso central é limitada após danos tissulares, é crucial o desenvolvimento de novas abordagens que otimizem o retorno funcional após IME. As opções de tratamento tardio em cães e em gatos não estão disponíveis e os aspectos de segurança e terapêutico do transplante autólogo de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMC) não foram ainda descritas anteriormente. O objetivo desta pesquisa é isolar e caracterizar as BMMC em cães e em gatos; selecionar cães e gatos com IME crônica; elaborar uma abordagem terapêutica à IME utilizando BMMC e realizar um acompanhamento dos animais após a terapia celular. Foi realizado um estudo epidemiológico verificando a ocorrência de lesões traumáticas tardias em gatos usando tomografia computadorizada. Em adição, quatro cães foram clinicamente avaliados e examinados por ressonância nuclear magnética. BMMC foram cultivadas *in vitro* e caracterizadas previamente ao seu uso na medula espinhal durante ato cirúrgico empregando procedimento padronizado para a área de IME. Observou-se recuperação progressiva dos reflexos de pânico, de dor superficial e profunda após a terapia celular, muito embora tenham sido ainda pobres os reflexos proprioceptivos em adição a hiperreflexia nos membros pélvicos que apresentavam respostas insuficientes e atáxicas. Todos os animais apresentaram ganhos progressivos após a terapia celular. A recuperação do reflexo consciente ocorreu simultaneamente a uma moderada melhora na função de controle dos intestinos e da vesícula urinária. A obtenção de BMMC em cães e em gatos foi simples e segura. Estas células apresentaram plasticidade equivalente em cães e em gatos. Entretanto, nenhum dos ganhos clínicos puderam ser correlacionados às alterações nas imagens obtidas por ressonância nuclear magnética em cães. Os resultados desta pesquisa indicam que BMMC são potenciais candidatas à terapia celular em traumas raquimedulares. Sugerem ainda que uma única aplicação de BMMC autólogas em IME em cães e gato não foram suficientes para o retorno clínico funcional completo, porém melhoraram a qualidade de vida desses animais.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais de medula óssea autólogas, terapia celular, reabilitação, canino, felino.

PENHA, Euler Moraes. Mesenchimal stem cells application to treatment of spinal Cord naturally acquired injury in dogs and cats. 92f. il. Tese (doutorado). – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Lesion mechanisms and its evolution following spinal cord injury (SCI) involves neuronal death by both necrosis and apoptosis. Since regeneration of the central nervous system is limited after injuries, it is crucial to develop novel approaches that optimize functional recovery after SCI. Stem cell-based therapy has been investigated in a number of degenerative and traumatic diseases, including SCI. Late spinal cord injury treatment options in dogs and cats are not available. Neither the safety aspects and therapeutic effects of autologous bone marrow mesenchymal stem cell (BMMC) transplantation, in dogs and cats, have been previously reported. The aim of this research was to isolate and characterize BMMCs in dogs and cats; to select dogs and cats with chronic SCI; to elaborate a therapeutical protocol to the SCI using BMMC and to perform a follow-up of the animals after BMMC therapy. We draw an epidemiological late traumatic lesions occurrence in cats using computerized tomography. In addition, dogs were clinically evaluated and examined using nuclear magnetic resonance. BMMC were cultured *in vitro* and characterized prior to administration into the spinal cord during a surgical procedure using a padronized protocol within the SCI area. We observed a progressive recovery of the paniculti reflex and diminished superficial and deep pain response after cell therapy, although there were still low proprioceptive reflexes in addition to a hyper-reflex in the ataxic hind limb movement responses. All animals demonstrated an improvement in these gains over time. Conscious reflex recovery occurred simultaneously with moderate improvement of intestine and urinary bladder functions. The acquisition of BMMC in dogs and cats was feasible and safe. Those cells presented plastic potential equivalent in dogs and in cats. However, no clinical gain was associated with alterations in magnetic resonance imaging in dogs. Our data indicate that BMMC are potential candidates for the stem cell therapy following spinal cord injury. Also, it suggest's that a single application of autologous BMMC within chronic SCI in dogs and cat was not enough to a complete clinical recovery but increased welfare aspects.

Keywords: Autologous bone marrow mesenchymal stem cells, cellular therapy, rehabilitation, canine, feline.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS:.....	12
1.2	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA	13
1.3	ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS DA MEDULA ESPINHAL.....	14
1.4	LESÕES RAQUIMEDULARES	16
1.5	TERAPIA CELULAR	19
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MANUSCRITO I	25
5	MANUSCRITO II	39
6	MANUSCRITO III	45
7	DISCUSSÃO	54
8	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO I	75
	ANEXO II – MATERIAL SUPLEMENTAR (VÍDEOS).....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTMO	Célula-tronco oriunda de medula óssea
CTN	Células-tronco neuronais
DAI	Doença auto-imune
DDIV	Doença do disco intervertebral
FCMMO	Fração de células mononucleares da medula óssea
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito (do inglês, <i>Granulocyte stimulating factor</i>)
GFAP	do inglês, <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês, <i>Green fluorescent protein</i>)
IME	Injúria da medula espinhal
MO	Medula óssea
BMMSC	Célula tronco mesenquimal derivada de medula óssea (do ing. <i>marrow mesenchymal stem cell</i>)
BMMC	do inglês, <i>Bone Marrow Mesenchymal Cells</i>
cBMMSC	Célula tronco mesenquimal derivada de medula óssea na espécie canina (do inglês, <i>canine bone marrow mesenchymal stem cell</i>).
SCI	do inglês, <i>spinal cord injury</i>

SNC	sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS:

A terapia reparadora ou regenerativa tem como procedimento básico o transplante autólogo de células-tronco. Estas células têm a capacidade de se autorregenerar e de se diferenciar em tipos celulares com características próprias e funções especializadas, como células nervosas (WOODBURY *et al.*, 2000); ou de se fundir a células lesionadas (TERADA *et al.*, 2002); e/ou ainda de secretar mediadores celulares que recrutam células-tronco residentes (UEMURA *et al.*, 2006) trazendo resultados promissores com relação ao retorno morfológico e/ou funcional de algumas doenças anteriormente descritas como intratáveis.

A fonte de CT adultas mais empregada e por mais tempo reconhecida é a medula óssea. Neste tecido estão presentes dois sistemas principais originados de linhagens distintas - o próprio tecido hematopoiético e o estroma de suporte associado. As células mesenquimais (ou estromais) isoladas a partir da medula óssea são progenitoras de componentes estruturais e fornecem o estroma de suporte da hematopoiese (KADIYALA *et al.*, 1997; MEIRELLES e NARDI, 2003). Além da medula óssea, vários outros tecidos possuem suas próprias CT mesenquimais, como sangue periférico, tecido adiposo, polpa dentária, bulbo olfatório (fonte de linhagens neurogênicas), tendões, músculo esquelético e cardíaco (LOVELL-BADGE *et al.*, 2001; HUNG *et al.*, 2002; ZUK *et al.*, 2002; BAKSH *et al.*, 2004; MAUTES *et al.*, 2004; WAGNER *et al.*, 2005; ROMANOV *et al.*, 2005; LINKE *et al.*, 2005). As CT adultas podem ser obtidas do próprio paciente para utilização terapêutica sem gerar tanta controvérsia nos aspectos de acessibilidade, praticidade e ética, e por isso têm atraído a atenção e esforços de pesquisadores de diversas áreas.

As células-tronco da medula óssea (CTMO) têm a capacidade de diferenciação em outras linhagens celulares específicas, incluindo células neurais, quando transplantadas em roedores, canídeos e humanos, e em modelos experimentais *in vitro* (HOFSTETTER *et al.*, 2002; HUNG *et al.*, 2002; GOOLSBY *et al.*, 2003). Ainda não é claro qual fração das CTMO é mais propensa a se diferenciar em tipos celulares de diferentes origens embrionárias *in vivo*. A transdiferenciação de CTMO em células neurais merece atenção especial, e isso se

deve a potencial importância desse evento biológico em terapias regenerativas para distúrbios cerebrais e espinhais (HULSEBOSCH, 2002; MYCKATYN *et al.*, 2004).

Baseado nestes argumentos, trabalhos abordando os aspectos terapêuticos de CTMO vêm sendo desenvolvidos em uma escala crescente em diversos países (PETERSE *et al.*, 2009; .

1.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA

Células-tronco são células não-especializadas com características importantes que as distinguem de outros tipos celulares, por apresentarem: 1) capacidade de se dividir e de renovar-se por longos períodos; 2) viabilidade em longo prazo de manutenção de um cariótipo normal e 3) potencial de se diferenciarem em células especializadas. Elas representam uma fonte de recursos inestimável para reparação tecidual e homeostasia (BIANCO e ROBEY, 2001; LOVELL-BADGE, 2001).

O potencial de diferenciação das células-tronco embrionárias está caracterizado extensamente. Entretanto, seu uso clínico encontra dificuldades éticas, filosóficas e políticas. Nesse contexto, o uso de células-tronco adultas torna-se uma alternativa a ser explorada. Já foi demonstrado que células-tronco adultas não têm um limite potencial para a produção de células diferenciadas (DONOVAN e GEARHART, 2001; LOVELL-BADGE, 2001).

Em 1970 as primeiras células mesenquimais foram descritas como precursoras estromais multipotentes por Friedenstein e colaboradores (BAKSH *et al.*, 2004). A medula óssea está presente em grande quantidade no corpo, sendo de fácil obtenção, além de permitir cultivos com proliferação estável. Células-tronco adultas derivadas de medula óssea (CTMO) demonstraram capacidade de diferenciação *in vitro* em adipócitos, condrócitos, osteócitos, miócitos (ZUK *et al.*, 2002; BAKSH *et al.*, 2004; WAGNER *et al.*, 2005; ROMANOV *et al.*, 2005), e em células nervosas (HUNG *et al.*, 2002). Diversos trabalhos sugerem que células da MO podem se diferenciar em células do SNC, incluindo neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KEIRSTEAD *et al.*, 1999; MEZEY *et al.*, 2000; MAHMOOD *et al.*, 2001; HUNG *et al.*, 2002). Embora não esteja claro ainda qual

fração das CTMO é mais propensa a se diferenciar em tipos celulares de diferentes origens embrionárias *in vivo*, a transdiferenciação de CTMO em células neurais merece atenção especial, e isto se deve à potencial importância desse evento biológico em terapias regenerativas baseadas em células para desordens neurológicas (PLUCHINO *et al.*, 2005).

Tecidos com potencial de regeneração tem sido objeto de interesse de pesquisadores e sua tradução das pesquisas para a realidade clínica tem sido alcançada cada vez em mais áreas. Goolsby *et al.* (2003) observaram a permanência de células-tronco medulares marcadas imunologicamente (CD34+) em massa encefálica após um ano de estudo. Dessa forma, essas células tornam-se interessantes candidatas como agentes terapêuticos na reparação tecidual e na terapia de doenças neurológicas causadas por inúmeras desordens.

O uso clínico de células-tronco adultas derivadas da punção de medula óssea pode apresentar algumas dificuldades. Dentre elas, a possibilidade do estado de morbidade do paciente interferir no rendimento de células, ocasionando a recuperação de baixos números de células por punção. Isto aumenta o tempo de cultura requerido para gerar dose terapêutica celular. A recuperação de quantidade satisfatória de células e o potencial de proliferação dessas células podem também sofrer interferência de fatores como idade, sexo, massa corpórea ou tratamentos com drogas (SCHULTZ e LIPTON, 1982; ROMANOV *et al.*, 2005; STREM *et al.*, 2005).

O isolamento e a caracterização fenotípica das células-tronco de medula óssea têm sido demonstrados em outras espécies, como em murinos (MEIRELLES *et al.*, 2003), leporinos (WAKITANI *et al.*, 1994), ovinos (SHANG *et al.*, 2001), suínos (RINGE *et al.*, 2002), eqüinos (WORSTER *et al.*, 2000) e bovinos (NIKU *et al.*, 2004). Ainda assim, o estudo das células-tronco de animais oferece um vasto campo de pesquisa.

1.3 ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS DA MEDULA ESPINHAL

Na espécie canina, a raquimedula (ou medula espinhal) está localizada dentro do canal vertebral sendo formadas por raízes sensitivas e motoras (respectivamente dorsais e

ventrais) unindo-se a saída de cada forame intervertebral e são definidas como segmento medular, formando os nervos espinhais do sistema nervoso periférico (FERNÁNDEZ; BERNARDINI 2010; LECOUTEUR e CHILD, 1992). A medula possui duas intumescências, e por este motivo, pode ser dividida em quatro segmentos: cervical, composto pelas cinco primeiras vértebras cervicais (C1-C5), cervicotorácico ou intumescência cervical (C6-T2), toracolombar (T3-L3), e lombossacral ou intumescência lombar (L4-S3); essa última compreende também a parte terminal da medula (FERNÁNDEZ; BERNARDINI, 2010).

No cão, os discos intervertebrais representam aproximadamente 18% do comprimento da espinha sendo mais espessos nas regiões cervical e lombar, e mais estreito na coluna vertebral torácica (BRAUND, 1996). São ao todo 26 e estão presentes nos corpos das vértebras com exceção do espaço entre o atlas e o axis, e na região sacral (FERNÁNDEZ; BERNARDINI 2010). São compostos por um núcleo pulposo mais interno e um anel fibroso mais externo. Os discos intervertebrais formam coxins entre as partes ósseas de vértebras adjacentes, permitindo o movimento, minimizando e absorvendo os impactos e unindo segmentos da coluna vertebral (BRAY e BURBIDGE, 1998; COSTA, 2001).

Com uma secção transversal da medula espinhal é observado um canal central circundado por substância cinza em uma figura semelhante ao grafema H chamada de "H medular". Na região cinza da medula se encontram os corpos celulares dos neurônios que de acordo com suas conexões são classificados em interneurônios, neurônios de projeção (que projetam axônios através da substância branca em direção ao cérebro) e neurônios eferentes (que enviam axônios para as raízes ventrais). Bilateralmente a substância cinza é constituída pelas colunas dorsal e ventral e conectadas por uma substância cinza intermediária. Cada segmento deste conjunto, em cortes transversais, é denominado de corno. Nos cornos ventrais estão contidos os neurônios somáticos eferentes que inervam os músculos esqueléticos. Nos

cornos dorsais estão contidos interneurônios e neurônios de projeção (EURELL e FRAPPIER 2006).

1.4 LESÕES RAQUIMEDULARES

A lesão medular é definida pela American Spinal Injury Association (ASIA) como sendo uma diminuição ou perda da função motora e/ou sensorial e/ou anatômica, podendo ser uma lesão total ou parcial, devido ao trauma dos elementos neuronais dentro do canal vertebral (DEFINO, 1999). Quando instalada de forma súbita, traz consigo consequências devastadoras, tanto por uma modificação radical da anatomo-fisiologia, quanto pelos efeitos psicológicos (HOFFMAN, 2011).

Entre as causas de lesão medular encontram-se as de origem traumáticas e as não traumáticas. Diversas são as perturbações não traumáticas que podem lesionar a medula espinhal, entre elas as disfunções vasculares, infecções, neoplasias espinhais, subluxações vertebrais secundárias à artrite reumatoide ou doença articular degenerativa. Estima-se que as etiologias não traumáticas respondam por 30% de todas as lesões da medula espinhal. As influências traumáticas são, de longe, a causa mais frequente de lesão nas populações humana (UMPHERED e SCHINEIDER, 1994) e canina (SMITH e WALTER, 1985) adultas e resultam dos danos causados por acidente de automóvel, queda ou ferimento por arma de fogo.

A ocorrência de compressão raquimedular é frequente em cães, tanto em função de acidentes automobilísticos quanto devido à doença do disco intervertebral (DDIV), especialmente na interface toraco-lombar. Os discos protruídos e/ou extrusos levam a uma compressão das delicadas terminações vasculares da raquimedula acarretando descontinuidade no suprimento sanguíneo e desta maneira é considerado um evento traumático. A fisiopatologia está relacionada a um quadro de disfunção motora e sensitiva (HULSEBOSCH, 2002; NORENBORG *et al.*, 2004) e que cursam com paraplegia completa e crônica (BLIGHT *et al.*, 2009) além de complicações urológicas (CRAGGS *et al.*, 2006; SAMSON e CARDENAS, 2007) e ambas as disfunções são condições crônicas e que

demandam tratamento contínuo em humanos (HERRERA *et al.*, 2010) e são também as principais causas de baixa qualidade e baixa expectativa de vida em animais de companhia (OLBY, 1999; SHARP e WHEELER, 2005).

No cão, as hérnias de disco são classificadas em tipo I (extrusão) e tipo II (protrusão), e o tratamento nesse último quadro pode ser conservador ou cirúrgico. Dentre os procedimentos cirúrgicos descritos para tratamento da DDIV toracolombar, tem sido indicada a fenestração lateral junto a procedimentos descompressivos como a laminectomia e a hemilaminectomia (TOOMBS e BAUER, 1998). A fenestração do disco intervertebral remove o material discal remanescente e reduz a recorrência de extrusões, prevenindo futura doença do disco intervertebral. A cirurgia descompressiva possibilita a remoção do material discal do interior do canal medular, reduzindo a isquemia e a disfunção da medula espinhal provocada pela compressão, sendo essencial em cães paraplégicos (TOOMBS e BAUER, 1998). Entretanto, após 48 horas de deflagrado o processo isquêmico raquimedular, secundário à compressão, os resultados cirúrgicos não são suficientes para o retorno funcional do indivíduo. Desta maneira, o tratamento cirúrgico só é indicado para pacientes com recidiva ou progressão dos sinais, paraparesia não ambulatória, paraplegia com preservação da dor profunda ou sua ausência com menos de 48 horas (SHARP e WHEELER, 2005). Cabe salientar que nenhum tratamento é recomendado para animais com mais do que 48 horas de perda de dor profunda. Os tratamentos praticados atualmente têm por objetivo controlar mecanismos secundários à lesão (por exemplo, liberação de radicais livres). Tradicionalmente, em animais que apresentam lesão grave e crônica em medula toracolombar, a conduta médica optada pela maioria dos médicos veterinários é a eutanásia. Na cidade de Salvador essa conduta também é a mais usual. Estudos de caracterização ou descrição da frequência das lesões raquimedulares no cão e no gato domésticos não foram encontrados na literatura brasileira.

Sunderland, em 1951, classificou as lesões raquimedulares em cinco graus: 1º grau – correspondente à neuropraxia – existe um bloqueio de condução nervosa e o restabelecimento completo da função é possível; 2º grau – correspondente à axoniotmese – a lesão é confinada ao axônio, a bainha do endoneuro permanece intacta e ocorre degeneração walleriana; a recuperação depende no nível e gravidade da lesão; 3º grau – existe perda da continuidade de fibras dentro do perineuro intacto, causando recuperação funcional pobre; 4º grau – ocorre descontinuidade fascicular, porém o epineuro permanece íntegro; existe perda completa de

função motora e sensitiva; 5º grau – há perda da continuidade do tronco nervoso e a probabilidade da restauração da função é mínima. Os três últimos graus correspondem a divisões da neurotmeze. As neuropatias resultantes de compressão mecânica causam desmielinização focal e degeneração axônica secundária (GALI e MEIRELES JR, 1999). O tratamento desses tipos de lesão depende de vários fatores e a depender do grau pode ser conservador ou cirúrgico. O tratamento conservador indicado para os dois primeiros graus é baseado principalmente no repouso absoluto do paciente o que acarretaria uma fibrose e cicatrização do material herniado. Tradicionalmente, lesões de 3º grau compressivas por mais de 48 horas, lesões de 4º e lesões de 5º grau não possuem quaisquer modalidades de terapia curativa aceitas em nenhuma das espécies devido à falta de expectativa de retorno à função locomotora (KNECHT, 1972; SHARP; WHEELER, 2005).

Historicamente, a mais antiga descrição da lesão da medula espinal encontra-se nos papiros de Edwin Smith, datado de 1700 a.C., que relatam que as fraturas da coluna vertebral como sendo uma “enfermidade que não deve ser tratada” (BREASTED, 1930; HUGHES, 1988). Credita-se a Hipócrates o avanço no tratamento das lesões da coluna. O método Hipocrático de tratamento com o uso da tração axial para a redução e o alinhamento vertebral, aplicando-se uma força anterior à gibosidade, perdura por séculos (CRISTANTE, 2005). E apesar de milênios de evolução nos métodos de tratamento das lesões de coluna, até o ano de 1980 seria impensável a hipótese de regeneração do sistema nervoso. O primeiro experimento com regeneração axonal comprovada foi conduzido por Richardson *et al.* (1980) após transplantarem axônios danificados do sistema nervoso central (SNC) para o sistema nervoso periférico (SNP). Sabe-se que a regeneração do SNC decorrente de isquemia, trauma e doenças degenerativas é limitada. O processo regenerativo de danos sofridos ao SNC, em especial à medula espinhal, apresenta restrições principalmente no que diz respeito à sua capacidade limitada de repor as células danificadas (JOHANSSON *et al.*, 1999).

Recentemente, porém, a terapia celular vem sendo considerada uma opção para distúrbios neuronais encefálicas (PLUCHINO *et al.* 2005) e raquimedulares (TENG *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2006; KEIRSTEAD *et al.*, 2006).

1.5 TERAPIA CELULAR

A atração e direcionamento de CT por sinais de células inflamatórias têm sido relatados por muitos autores. É possível que o microambiente tecidual extra-hematopoético resultante de apoptose ou necrose permita um enxerto eficiente das CT circulantes, onde estas seletivamente visam o tecido lesionado e promovem recuperação funcional (CHOPP e LI, 2002; HERZOG, CHAI e KRAUSE, 2003). Além da atração, acredita-se que a diferenciação das CT também é fortemente influenciada pelo local no qual elas são colocadas, através de sinais ambientais e deficiências no funcionamento celular nas áreas de implantação (KEIRSTEAD *et al.*, 1999).

Em caninos, o uso de células-tronco tem sido sugerido na tentativa de reparo em algumas doenças (KADIYALA *et al.*, 1997). Takahashi e colaboradores (2004) relataram o uso bem sucedido da terapia celular na promoção de neovascularização pulmonar em cães com hipertensão pulmonar primária, doença refratária onde há piora clínica do paciente a despeito de qualquer tratamento. Os autores ressaltaram uma melhora clínica da pressão arterial pulmonar, no débito cardíaco e na resistência vascular pulmonar. Histologicamente revelou-se uma melhora na espessura média da artéria pulmonar e uma neovascularização do parênquima pulmonar.

Estudos com recuperação de tecido ósseo lesado de cães, tratado com implantes de cilindros de hidroxiapatita enriquecidos com células-tronco, mostraram uma aceleração no processo de reparo de fraturas em fêmur de cães (ARINZEH *et al.*, 2003). Muschler e colaboradores (2003 e 2005) demonstraram que o uso de uma matriz óssea enriquecida com células-tronco de medula óssea permitiu uma melhora significativa na resolução de transplantes ósseos em cães. Os autores ressaltaram ainda a rapidez, simplicidade e segurança da utilização de hidroxiapatita associada a células-tronco nos transplantes, o que favoreceu ainda o aumento da concentração de células progenitoras em até 5,6 vezes em comparação com transplantes utilizando somente matriz óssea.

Doenças cardíacas crônicas, tais como a isquemia e patologias cardíacas hipertensivas, são caracterizadas pela perda irreversível de cardiomiócitos. O conceito geral, aceito pela cardiologia contemporânea, é que cardiomiócitos em adultos perdem a habilidade

de regenerar o miocárdio, o que leva ao desenvolvimento e progressão da falha cardíaca (HASSINK *et al.*, 2003).

Linke e colaboradores (2004), em estudos sobre regeneração de miocárdio em cães, após indução de infarto pela oclusão de artéria coronária esquerda descendente, observaram uma progressiva melhora da função cardíaca com o uso de células progenitoras cardíacas. Os autores afirmam que a técnica foi capaz de ativar a reserva de crescimento de miocárdio mostrando ser esta uma importante estratégia de reparo cardíaco após injúrias isquêmicas agudas. Resultados positivos também já foram alcançados em modelos de isquemia miocárdica crônica em cães (SILVA *et al.*, 2005) demonstrando uma melhora na morfologia e na função cardíaca após transplante de células-tronco derivadas de medula óssea.

Em lesões crônicas do miocárdio, como em casos de cardiomiopatia chagásica, o emprego da terapia celular utilizando transplante de células tronco da medula óssea, demonstrou diminuição do infiltrado inflamatório e da fibrose características da doença, sugerindo ser esta uma terapia efetiva (SOARES *et al.*, 2004).

O interesse por modelos experimentais que permitam investigar a viabilidade de terapias celulares aumentou muito. O cão portador de doença natural é um modelo experimental bastante adequado para o estudo e entendimento da medicina regenerativa ou de reparo pelo uso de terapia celular, visto que boa parte das doenças caninas assemelha-se funcional e estruturalmente às descritas em humanos (PEDERSEN, 1999). De igual importância ao se conhecer as lesões causadoras de distúrbios nervosos é poder acompanhá-las de forma não invasiva ou minimamente invasiva com terapia padronizada.

Nos primeiros estudos, o emprego de células tronco neuronais (CTN) foi considerado o ideal em termos de terapia regenerativa (FINE, 1994). A evidência da existência de células-tronco multipotentes neural na medula espinhal do adulto é amplamente baseada em estudos *in vitro*. Células com capacidade de auto-renovação contínua e com potencial de diferenciação em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos podem ser propagadas “*in vitro*” (JOHANSSON *et al.*, 1999;. SHIHABUDDIN *et al.*, 1997;. WEISS *et al.*, 1996). Tais células com propriedades neurais de células-tronco estão presentes em todo o eixo rostrocaudal da medula espinhal adulta (SHIHABUDDIN *et al.*, 1997;. WEISS *et al.*, 1996). Entretanto devido a sua disponibilidade limitada, fontes alternativas ao transplante neuronal, como com CT embrionárias (CTE), CT de medula óssea (CTMO), CT oriundas de tecido adiposo (CTA),

CT de cordão umbilical (CTC) vêm sendo investigadas (KADIYALA *et al.*, 1997; McKAY, 1997; KOPEN *et al.*, 1999; PETERSEN *et al.*, 1999; PLUCHINO *et al.*, 2005, KANG *et al.*, 2006; LIM *et al.*, 2007a). As células obtidas destas fontes adicionais são capazes de sobreviver, proliferar, migrar e diferenciar em células que expressam fenótipos neuronais no cérebro e raquimedula lesionados (AKIYAMA *et al.*, 2002; MAUTES *et al.*, 2004; TENG *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2004).

Há crescentes evidências indicando que a neurogênese e gliogênese endógenas podem ocorrer como parte de um processo de auto-reparação intrínseco do cérebro, durante toda a vida adulta, porém acredita-se que, apesar de existirem células tronco neurais no cérebro adulto, estas têm uma capacidade limitada de gerar novos neurônios funcionais em resposta ao dano. O sistema nervoso, ao contrário de muitos outros tecidos, tem uma capacidade limitada de auto-reparação e células nervosas maduras são desprovidas da habilidade de regeneração. Por esta razão, há um grande interesse na possibilidade de reparo do sistema nervoso pelo transplante de novas células que podem substituir as perdas por danos ou doença (BJÖRKLUND e LINDVALL, 2000; PLUCHINO *et al.*, 2005).

Considerando-se a complexidade estrutural e morfológica do cérebro, pode parecer irreal induzir recuperação funcional por substituição de células perdidas através de doenças. Entretanto estudos em modelos animais têm mostrado que reposição neuronal e reconstrução parcial de dano no circuito neuronal são possíveis. Há também evidências de ensaios clínicos em que a substituição celular em doenças do cérebro humano pode levar a alívio sintomático (LINDVALL, KOKAIA e MARTINEZ-SERRANO, 2004).

Avaliação do potencial de reparo de danos em medula espinhal também é alvo de pesquisa. O perfil neuroprotetor das CT para lesões espinhais agudas foram demonstradas em rato por Vroemen *et al.* (2003) a partir da diferenciação morfológica em oligodendrócitos e astrócitos e sua integração ao longo das vias axonais. De maneira complementar, Pfeifer *et al.* (2004) demonstraram que o enxerto de CT neuronais aumentou significativamente a regeneração axonal, através de diferenciação em astróglia resultando em uma completa restauração morfológica em medula espinhal agudamente tratadas, em ratos. Diante da comprovação do benefício terapêutico do uso de CT em lesões espinhais agudas, investigou-se também o efeito benéfico da administração local de células estromais da medula óssea em longo prazo em paraplegia crônica (ZURITA E VAQUERO, 2006).

É fato que, em muitos estudos, a demonstração de recuperação clínica nos animais transplantados com CT foi feita à margem de demonstrações concretas de que as CT foram as responsáveis diretas pela reconstrução tecidual (AKIYAMA, RADTKE e KOCSIS, 2002; KEIRSTEAD *et al.*, 2005). Diante disso, muitos autores têm defendido que o benefício da terapia com CT em desordens do SNC se dá por mecanismos de neuroproteção (CHOPP e LI, 2002; GROVE, BRUSCIA e KRAUSE, 2004). Pluchino *et al.* (2005) relataram que eventos patológicos como eventos traumáticos, inflamatórios ou isquêmicos podem despertar uma cascata de sinais celulares e moleculares, possivelmente via liberação de mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas, metaloproteases e moléculas adesão, dentre outros, que são capazes de dar suporte a neurogênese e gliogênese e conduzindo o reparo tecidual.

Mesmo com bons resultados em diversas espécies e com os recentes progressos da terapia celular, o otimismo a cerca de uma possível cura para distúrbios neurológicos, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes é ainda o maior desafio médico (BLESCH *et al.*, 2002; TENG *et al.*, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

A expectativa de vida das populações humana e canina tem passado por um período de longevidade superior ao que se observava anteriormente. O padrão alimentar, atividade física e comportamental desenvolvida e os modernos avanços da medicina podem ser incriminados como fatores principais para esta mudança. Infelizmente este padrão de vida moderno traz também consigo a possibilidade de ocorrência cada vez maior de alterações degenerativas e incidência de lesões traumáticas. O surgimento dessas doenças em cada vez mais indivíduos requer uma demanda de técnicas que as resolva eficientemente, proporcionando qualidade de vida a estes pacientes.

Em particular para este trabalho, especialmente em traumatismos diretos na medula raquidiana (DEFINO, 1999) os danos são considerados, até agora, irreparáveis sendo tratados tradicionalmente com utilização drogas que nem sempre apresentam resultado satisfatório quanto à sua recuperação funcional (De RISIO, 2009), comprometendo definitivamente a qualidade de vida do indivíduo. Desenvolver um estudo para avaliação da função reparadora

das células troncos em cães e em gatos visando à avaliação dos efeitos da terapia celular nesses animais é imprescindível.

Os resultados obtidos permitirão a elaboração de parâmetros aplicáveis ao estudo da eficácia do transplante de células tronco no tratamento de cães e gatos domésticos, buscando a melhora da qualidade de vida e conseqüentemente, expectativa de vida e, em uma perspectiva mais ampla, buscar transportar os resultados para o modelo de uso desta terapia para o uso em humanos em um futuro breve. Além disso, não há na literatura nacional a presença de trabalhos que avaliem a casuística/ epidemiologia dos casos e nem tampouco estudos que retratam o potencial terapêutico das CTMO autólogas em pacientes caninos e felinos para lesões raquimedulares crônicas, mostrando a relevância deste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar clinicamente cães e gatos domésticos que sejam portadores lesões raquimedulares compressivas/isquêmicas e que tenham sido submetidos ao tratamento por meio de terapia com células-tronco mesenquimais autólogas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar células-tronco a partir de aspirado de medula óssea de cão e de gatos domésticos;
- Selecionar cães e gatos domésticos portadores de lesões raquimedulares crônicas e avaliar a frequência dos achados na cidade de Salvador;
- Padronizar método de utilização da terapia celular para o tratamento de lesões no sistema nervoso raquimedular e aplicá-lo nos animais selecionados;
- Acompanhar a evolução clínica dos animais tratados para verificação da potencial eficácia da terapia celular a partir de exames clínicos e de imagem;

4 MANUSCRITO I

O primeiro manuscrito intitulado: “Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis” descreve os resultados do primeiro estudo epidemiológico dos casos de felinos domésticos apresentando lesão raquimedular de ocorrência natural diagnosticados por tomografia computadorizada na Bahia. O manuscrito foi submetido e aceito pela revista PUBVET (PUBVET, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011. Homepage: <http://www.pubvet.com.br/>)

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

**Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study
and late characterization of lesions by computerized tomography
imaging analysis**

Euler Moraes Penha¹; Gillian Macário Cardoso²; Rodrigo Lima Carneiro³;
Emanoel Ferreira Martins Filho⁴; Deusdete Conceição Gomes Junior⁵; Vinicius
de Jesus Moraes⁶; Wagner Ribeiro Aguiar⁷; Milena Botelho Pereira Soares⁸

1- Doutorando em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pela Fundação Oswaldo Cruz. Funcionário do setor de diagnóstico por imagem da Universidade Federal da Bahia.

2. Médico Veterinário autônomo formado pela Universidade Federal da Bahia - UFBA.

3- Mestrando em Ciência Animal nos Trópicos - Universidade Federal da Bahia

4- Doutorando em Cirurgia Veterinária - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

5- Mestrando em Cirurgia Veterinária - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

6- Mestrando em Ciência Animal nos Trópicos – Universidade Federal da Bahia

7- Pós-Graduação em Matemática e Estatística – Universidade Federal de Lavras

8- Doutorado em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Abstract

Late complications of spinal cord injury in cats are not well known. Current imaging methods allow the acquisition of more detailed information and guide

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

the choice of treatment. We evaluated 22 cats, and in 6, we draw an epidemiological late traumatic lesions in the spinal cord, characterizing by means of computed tomography (CT), its natural evolution. The causes of trauma in the animals evaluated were falling through the window of apartment and car accidents, firearm, and intentional human assault. The location of trauma were: T7 to T11 in three cats, T12 to L2 in 17 cats; L3 to L7 in two cats. By CT we observed the presence of hypoattenuation area surrounding the spinal cord with atrophy in six cats. Compressive lesion was absent in one animal, one was mild, and severe in four others. Fractures in the dorsal and ventral compartments were observed in 50% and 33.34% of cases, respectively. In three animals the lesion was multiple and involved the pedicles and intervertebral discs. Although it was possible to locate and describe the lesions in the bone tissue, the observation and classification of lesions in adjacent soft tissues were unsatisfactory. Few animals survived after trauma to the spinal cord over the three years of observations, thus we indicate the use of other diagnostic tools like magnetic resonance imaging and electroneuromyography to develop more effective therapeutic approaches aiming the increasing of life expectancy with quality of animals with spinal cord injury.

Keywords: spinal cord, neurorthopedics, feline, spinal trauma

Lesões raquimedulares traumáticas em gatos: Estudo epidemiológico por três anos e caracterização tardia das lesões através da tomografia computadorizada

Resumo

As complicações tardias de lesão medular em gatos não são bem conhecidas. Os atuais métodos de imagem permitem a aquisição de informações mais detalhadas e direcionam a escolha do tratamento. Avaliamos 22 gatos, e em 6, traçamos um panorama epidemiológico tardio de lesões traumáticas na medula espinhal, caracterizando sua evolução natural por meio de tomografia

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

computadorizada (TC). As causas de trauma nos animais avaliados foram: queda através da janela de apartamento; acidente automobilístico; arma de fogo; e agressão humana intencional. O local do trauma foi: T7 a T11 em 3 gatos; T12 a L2 em 17 gatos; L3 a L7 em 2 gatos. Através da TC observamos a presença de área hipoatenuante circundante com atrofia da medula espinhal nos 6 gatos. Lesão compressiva estava ausente em um animal, em um era discreta, e grave em outros quatro. Fraturas nos compartimentos dorsal e ventral foram observadas em 50% e em 33,34% dos casos, respectivamente. Em três animais a lesão foi múltipla e envolveu os pedículos e discos intervertebrais. Apesar de ter sido possível localizar e descrever as lesões no tecido ósseo, a observação e classificação das lesões em tecidos moles adjacentes foram insatisfatórias. Poucos animais sobreviveram após o traumatismo na medula espinhal ao longo dos três anos de observação, desta forma indicamos que outras ferramentas de diagnóstico como a ressonância magnética e a eletroneuromiografia sejam utilizadas para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes objetivando aumentar a expectativa de vida com qualidade dos animais portadores de lesão medular.

Palavras-chave: medula, neurortopedia, felino, trauma raquimedular

INTRODUCTION

Trauma of the spine and spinal cord is one of the most usual neurological diseases in small animal clinics. It is usually a result of injury by gunshot, human being aggression, falls, and trampling. Traumatic rupture of spinal cord and soft structural tissue surrounding may cause fracture, vertebrae dislocation or subluxation and the traumatic extrusion of intervertebrae disk, and thus promote some spinal cord disfunction (OMOJOLA, 2011). The spinal trauma of sufficient magnitude to cause such injuries, commonly results in compression, contusion, concussion and laceration of the spinal cord (BRAUND, 1996; ; OMOJOLA, 2011), thus causing ataxia, paresis or paralysis in animals (CHRISMAN, 1985). These disorders frequently occur at the junction of

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

vertebral mobile segment with another segment property, or in its vicinity as a resultant of tension increasing (BRUECKER & SEIM, 1998).

The acute trauma of spinal cord usually results in neurological defects and mechanical breakdown by smashing the neural and vascular elements at the time of injury (BRAUND, 1996). The basic mechanisms in acute injury to the spinal cord are the anatomical interruption, compression, concussion and ischemia (SILVEIRA, 2005; BAHRI ARIAS et al., 2007; OMOJOLA, 2011), in addition to bruising, bleeding, edema and congestion, which usually are attached to most other lesions. The interruption of the spinal cord parenchyma caused by laceration of the nerve tissue can cause changes considered incurable and irreversible. The lesions cause a slight loss of proprioception, reflexes, causing serious loss of capacity to sustain weight loss of voluntary movement and finally the sensation of deep pain (WHEELER & Sharp, 1999a). Injuries cause slight loss of proprioception reflexes, causing serious loss of capacity to weight bearing, loss of voluntary movement and, at last, loss of deep pain sensation (WHEELER & SHARP, 1999a). The result of mechanical compression neuropathies is axonal degeneration and secondary demyelination (GALIS & MEIRELES JUNIOR, 1999). Although it has been demonstrated partial recovery of spinal lesions (BRUSTEIN & ROSSINGOL et al., 2007), the prognosis is always bad when there are complete lesions (FOSSUM, 2002).

Methods of diagnostic imaging contribute important information in defining the diagnosis and surgical planning, and establish a prognosis (LAURER et al., 2007). This study aims to describe the occurrence of spinal injuries in cats and characterize late natural spinal cord injuries of six domestic cats, by the CT scan.

MATERIAL AND METHODS

During three years there were observed 22 cats with spinal cord lesion located caudally to T7 vertebrae, within 1st degree and zero point of neurologic deficit obtained by behavioral assessment using the 15-point OLBY et al.

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

(2001) scoring system (Table 1). The cats' gait was independently scored before the beginning of radiographic assessment for spinal trauma evaluation.

Table 1. Assessment of pelvic limb function by Olby score*

Stage	Point	Neurological status
	0	No pelvic limb movement and no deep pain sensation.
1	1	No pelvic limb movement with deep pain sensation.
	2	No pelvic limb movement but voluntary tail movement.
2	3	Minimal non-weight-bearing protraction of pelvic limb (movement of one joint).
	4	
	5	Non-weight-bearing protraction of pelvic limb with more than one joint involved less than 50% of the time. Non-weight-bearing protraction of pelvic limb with more than one joint involved more than 50% of the time.
3	6	Weight-bearing protraction of pelvic limb less than 10% of the time.
	7	
	8	Weight-bearing protraction of pelvic limb 10-50% of the time. Weight-bearing protraction of pelvic limb more than 50% of the time.
4	9	Weight-bearing protraction 100% of time with reduced strength of pelvic limb. Mistake > 90% time.
	10	
	11	Weight-bearing protraction of pelvic limb 100% of time with reduced strength. Mistake 50-90% of the time. Weight-bearing protraction of pelvic limb 100% of time with reduced strength. Mistake < 50% of the time.
5	12	Ataxic pelvic limb gait with normal strength, but mistakes made > 50% of time.
	13	
	14	Ataxic pelvic limb gait with normal strength, but mistakes made < 50% of time. Normal pelvic limb gait.

*Olby et al., 2001.

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

Of the twenty-two cats studied, two animals are still alive. Twelve animals died in less than five weeks in consequence of the trauma or were euthanized due to injuries associated with spinal cord involvement, four died after two years due to other causes, and the six surviving cats underwent computed tomography, and two died of natural causes six months after the examination. The causes of trauma include falling through window of apartment building (9 cats; 40.9%); automobile accident (11 cats; 50%); firearms shot (1 cat; 4.5%) and intentional hitting trauma caused by a human being (1 cat; 4.5%). The location of trauma were thoracic (from T7 to T11; 3 cats; 13.6%); thoracic-lumbar (from T12 to L2; 17 cats; 77.3%) and lumbar (from L3 to L7; 2 cats; 9.1%).

The six animals were evaluated with CT examination in a fourth generation scanner (Picker IQ / Xtra, Phillips Medical Systems, USA). Technical settings for all CT scans were: 130 kVp, mAs 440, 480 cm field size, image size 160 cm, slice thickness 5 mm and slice gap of 4 mm. Every animal was induced to anesthetic plane with propofol (8 mg / kg) and submitted to tracheal intubation for inhalator anesthesia with isoflurane (0.6-2L rate: min, concentration of 0.5 to 4%). During all procedure the cats were monitored by a multiparametric equipment (SURGIVET – model V9203 – Wankesha – USA).

For classification of lesions using CT there were used six qualitative parameters, as follows: (a) attenuation of the subarachnoid space – defined by loss of ventral epidural fat, decreased subarachnoid space, deformed spinal cord, and small spinal, (b) fracture in the dorsal compartment, (c) fracture within the ventral compartment, (d) spinal stenosis - defined as narrowing of the vertebral canal/foramina due to thickened lamina, thickened pedicles and/or bulbous articular processes (JACOBSON at al., 1975; BARNETT et al., 1987), (e) Multiple lesions occurrence – defined as fractures located within dorsal and ventral compartments and (f) Spinal cord deformity - defined as ventral concavity in cord margin, unilateral flattening of cord margin, lateral deformity on both sides of cord, and/or triangle-shaped cord (spinal cord atrophy) (YU et al., 1986). The classification of compression by hypodense

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

area and by direct measurement of the area of the spinal canal from measurements in axial are described in table 2 (A and B). The parameters of fracture in the dorsal or ventral compartment, and multiple compartments were classified as positive (1) or negative (0). The results are shown in table 3.

Table 2 – Compressive parameters evaluated by CT in cats

A - Compression estimative by hypodense area surrounding the spinal cord

Degree	Compression	Findings description
1	Absent	Presence of hypodense area surrounding all the spinal cord.
2	Discrete	Absence of hypodense area surrounding less than 20% of the spinal cord
3	Moderate	Absence of hypodense area surrounding from 20% to 45% of the spinal cord
4	Severe	Absence of hypodense area surrounding more than 45% of the spinal cord

B - Evaluation of spinal cord diameter

Degree	Classification	Findings
1	Absent	Lumen of spinal canal preserved *
2	Low compression	Lumen of spinal canal reduced until 15%*
3	Medium compression	Lumen of spinal canal reduced from 16% to 35%*
4	Severe compression	Lumen of spinal canal reduced more than 36%*

* when compared to a nearby vertebrae on the same animal.

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

Table 3 – Summary of late CT findings in natural spinal lesions in cats

Animal Parameter	1	2	3	4	5	6
Hypodense area surrounding the spinal cord	4	4	4	4	4	4
Dorsal compartment fracture	1	1	0	0	1	0
Ventral compartment fracture	1	0	0	0	1	0
Spinal compressions areas by axial CT slices by canal surface mensurations.	4	4	4	2	4	1
Multiple lesions localizations	1	1	0	0	1	0

RESULTS AND DISCUSSION

The causes of trauma observed with this research were the same as previously reported, but the occurrence of a larger number of lesions caused by falls (40.1%) was not expected. There are no data available on epidemiological survey of spinal injuries in cats linking the most frequent causes of their occurrence, as previously reported in the human beings (UMPHERED & SCHINEIDER, 1994) and canine (SMITH & WALTER, 1985). Despite the small number of animals evaluated, the principal cause of spinal trauma observed in domestic cats was far different from those observed in the others species: The first most prevalent cause was fall while in those species trampling is the most frequent cause (OMOJOLA, 2011). Cat's way of life has been changing interestingly in last decade, with the advent of even more owner's preference in apartment buildings. Surprisingly, almost all the buildings that have fallen cats were fitted with gauze of security, except in two (9.1%). Some of these were very old and others were not suitable for cats. In

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

one case (4.5%) the accident occurred at a residence equipped with safety equipment certificate for cats.

Lesions were more frequent from T12 to L2 vertebrae (77.3%) - the four live animals are included in this group - and two (9.1%) were located in lumbar spine. Those occurrences are corroborated by researchers (BRAUND, 1996; BRUECKER & SEIM, 1998). At least, in part, the absence of incoming patients presenting lesions from C1 to T7 vertebrae are supposed to occur due to cats lifestyle that doesn't allow the owners to indulge, then their pet gets sick, pondering they are not able to move back home. This data probably is misunderstood.

The injury further observed by CT was the severe compression of the spinal canal by absence of hypo signal surrounding cord area in 100% of cases with spinal cord atrophy (triangle shaped), what is corroborated by another researchers in other species (YU et al., 1986). When judged only by the compression caused by bone deformity, one animal (16.7%) had preserved area and one animal showed slight compression. Fracture in the dorsal compartment was observed in 50% of cases and within the ventral fracture in 33.34% of cases. In three animals (50%) injuries occurred in multiple locations. The summary of findings is shown in table 3 and figure 1.

It is believed that the occurrence of multiple lesions in 50% of the cases, justify the previously and widely reported difficulty in clinical classification of the lesions by other radiographic methods (BRAUND, 1996; WHEELER & SHARP, 1999b; SILVEIRA, 2005; BAHR ARIAS et al., 2007).

A very little number of cats had survived after spinal cord lesions within this research after a three years observation period. Efficient therapeutical approaches are required to increase life length with quality in cats.

With the CT it was possible to locate and describe the injuries, especially those that occurred in bone tissue. However, the observation and classification of lesions in adjacent soft tissues were not satisfactory. It is suggested the use of nuclear magnetic resonance and assessment by motor/sensitive evoked potentials for a more complete evaluation.

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

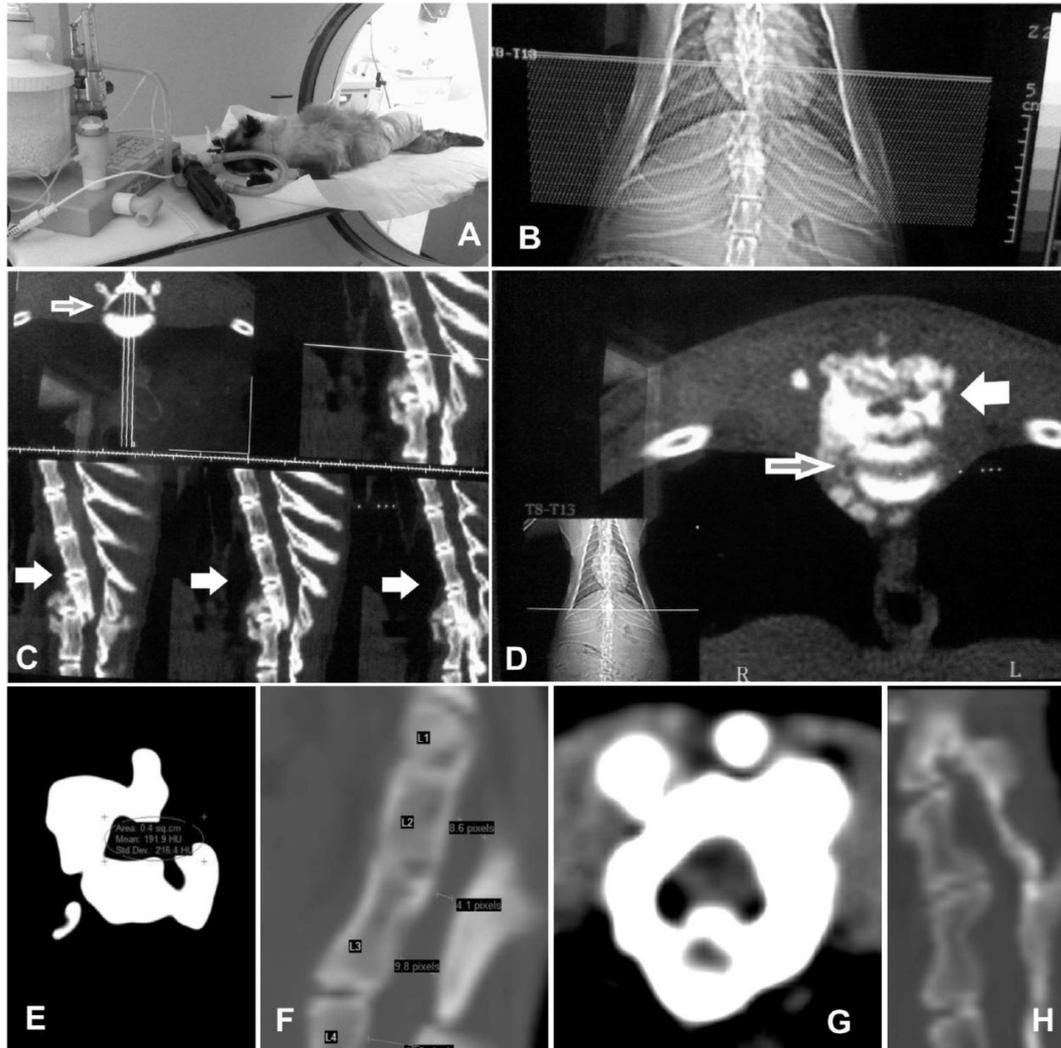


FIGURE 01: Technical implementation of the CT scan. (a) First the animal is under general anesthesia for (b) completion of scout, delimiting area to be assessed from Cross-Sectional sections. With the method it is possible to (c) take pictures of saggital (white arrows) or axial (open arrow), making a relationship of the lesions localization in both (white line). (d) From axial sections the location of the lesion can still be determined, if the injury is within the ventral (open arrow) and the dorsal (large white arrow). When changing the degree of contrast given the structures, for example, then the equipment in the window to skeleton (e) all the images corresponding to soft tissues

PENHA, E.M. et al. Traumatic spinal cord injury in cats: three years epidemiologic study and late characterization of lesions by computerized tomography imaging analysis. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 26, Ed. 173, Art. 1169, 2011.

(including spinal cord) are disregarded from view. From this window the area of cross section can be calculated (area surrounding by yellow dotted line) and the signal strength in the area so far (Figures in HU within the channel) (f) if it is of interest to assess the dimensions of channel and the degree of signal strength in a wide variety of items, it can be achieved with the use of two-dimensional reconstructions. (g) From axial sections can be observed around the hypodense area cord, thus suggesting the degree of spinal compression. (h) With the use of two-dimensional reconstruction is possible to have idea of the magnitude of compression. It is also to assess the degree of a new born bone by narrowing of spinal space.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by RENORBIO, CNPq, FINEP, and MCT. and for Dr. Modesto and his team for image processing support.

REFERENCES

BAHR ARIAS, M. V.; SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. **Semina**, v. 28, n. 1, p. 115-134, 2007.

BARNETT, G. H.; HARDY JR., R. W.; LITTLE, J. R.; BAY, J. W.; SYPERT, G.W. Thoracic spinal canal stenosis. **Journal of Neurosurgery**, v. 66, n. 3, p. 338-344, 1987.

BRAUND, K. G. Traumatismo agudo da medula espinal. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais**. São Paulo: Manole, 1996. p. 1311-1325.

BRUSTEIN, E.; ROSSIGNOL, S. Recovery of Locomotion After Ventral and Ventrolateral Spinal Lesions in the Cat. I. Deficits and Adaptive Mechanisms. **Journal of Neurophysiology**, v. 80, p. 1245-1267, 1998.

CHRISMAN, C. L. Paraplegia, Paraparesia e Ataxia dos Membros Posteriores. In: **Neurologia dos Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1985. p. 339-368.

FALAVIGNA, A.; RIGHESSO NETO, O.; FERRAZ, F. A. P.; BONIATTI, M. M. Fratura traumática de coluna torácica t1-t10. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, n. 4, p. 1095-1099, 2004.

FOSSUM, T. W. Neurocirurgia. In: _____. **Cirurgia de Pequenos Animais**, Roca, 2002. p. 1185-1309.

GALIS, J. C.; MEIRELLES JÚNIOR, J. S. Compressão pós-traumática do nervo fibular superficial. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 34, n. 6, p. 401-404, 1999.

HOFSTETTER, C. P.; SCHWARZ, E. J.; HESS, D. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 2199-2204, 2002.

JACOBSON, R.E., GARGANO, F.P., ROSOMOFF, H.L. Transverse axial tomography of the spine. Part 2: the stenotic spinal canal. **Journal of Neurosurgery**, v. 42, p. 412-419, 1975.

LAURER, HELMUT; MAIER, B; SAMAN, A. L.; LEHNERT, M.; WYEN, H.; MARZIL, I. Distribution of Spinal and Associated Injuries in Multiple Trauma Patients. **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v.33, p.476-481, 2007.

MACHADO, A. B. M. Estrutura da Medula Espinhal. In: **Neuroanatomia Funcional**. 2 ed. Belo Horizonte: Atheneu, 2000. p. 151-162.

OLBY, N. J.; De RISIO, L.; MUNANA, K. R.; WOSAR, M. A.; SKEEN, T. M.; SHARP, N. J.; KEENE, B. W. Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1624-1628, 2001.

OMOJOLA, M. F. Trauma to the spinal cord. In NALDICH, T. P. **Imaging of the spine**. Philadelphia: Elsevier, 2011. p. 237-246.

PARK, D. H.; EVE, D. J.; CHUNG, Y. G.; SANBERG, P. R. Regenerative medicine for neurological disorders. **The Scientific World Journal**, v. 16, p. 470-89, 2010.

PENHA, E. M.; AGUIAR, P. H. P.; BARROUIN-MELO, S. M.; LIMA, R.C; SILVEIRA, A. C. C.; OTELO, A. R. S.; PINHEIRO, C. M. B.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P. Cellular therapy and hemilaminectomy in clinical neurofunctional rehabilitation of a cat with raquimedular lesion: a case report. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE TERAPIAS AVANÇADAS & CÉLULAS-TRONCO, 2007, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: 2007.

ROSSIGNOL, S; Schwab, M; Schwartz, M; Fehlings, M. G. Spinal Cord Injury: Time to Move?. **The Journal of Neuroscience**, v. 44, n. 27, p. 11782-11792, 2007.
SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A.; ARIAS, M. V. B. **Fisiopatologia do trauma e da compressão à medula espinhal de cães e gatos**, v.1, n.2, p.78-85, 2007.

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

SILVEIRA, P. R. **Diagnóstico e Tratamento nas Emergências - Traumatismo Raquimedular**. 2005. Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/2667383/TRAUMA-RAQUIMEDULAR>>. Acesso em 13 de abril de 2010.

SMITH, G.K.; WALTER, M.C. Fractures and luxations of the spine. In: NEWTON, C. D.; NUNAMAKER, D. M. **Textbook of small animal orthopaedics**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 1985. cap. 19. Disponível em: http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_19/19mast.asp. Acessado em 01 de fevereiro de 2007.

THACHER, C. Biomecânica das Fraturas Cranianas, Espinhais e Luxações. In BOJRAB M. J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais**. São Paulo: Manole,1996. p. 1150-1160.

UMPHRED, D.A.: SCHNEIDER, F.J. **Fisioterapia Neurológica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1994.

YU Y.L.; DU BOULAY G.H.; STEVENS J.M., KENDALL B.E. Computed tomography in cervical spondylotic myelopathy and radiculopathy: visualisation of structures, myelographic comparison, cord measurements and clinical utility. **Neuroradiology**, v. 28, p. 221-236, 1986.

WHEELER, S. J.; SHARP, N. J. H. Anatomia Funcional. In: **Diagnóstico e Tratamento Cirúrgico das Afecções Espinhais do Cão e do Gato**. São Paulo: Manole, 1999a. p. 8-18.

WHEELER, S. J.; SHARP, N. J. H. Traumatismo In: **Diagnóstico e Tratamento Cirúrgico das Afecções Espinhais do Cão e do Gato**. São Paulo: Manole, 1999b. p. 171-191.

5 MANUSCRITO II

O segundo manuscrito intitulado: “Clinical neurofunctional rehabilitation of a cat with spinal cord injury after hemilaminectomy and autologous stem cell transplantation” descreve os resultados clínicos obtidos com a aplicação das CTM no primeiro caso de felino submetido ao tratamento no Brasil. O artigo foi submetido e aceito para publicação International Journal of Stem Cells em 8 de agosto de 2012 (Manuscript ID : IJST-12-007 Homepage: <http://www.ijstemcell.com>)

Clinical Neurofunctional Rehabilitation of a Cat with Spinal Cord Injury after Hemilaminectomy and Autologous Stem Cell Transplantation

Euler M. Penha^{1,2}, Paulo H. P. Aguiar¹, Stella Maria Barrouin-Melo¹, Ricardo S. de Lima^{2,3}, Ana Carolina C. da Silveira¹, Ana Rosa S. Oteló⁴, Claudia Maria B. Pinheiro⁴, Ricardo Ribeiro-dos-Santos^{2,5}, Milena B. P. Soares^{2,5}

¹Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, ²Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, ³Universidade Federal do Vale do São Francisco, ⁴Faculdade Zacarias de Góes, ⁵Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, Brazil

Stem cell-based therapy has been investigated in a number of degenerative and traumatic diseases, including spinal cord injury. In the present study, we investigated the use of autologous mesenchymal stem cells in the functional rehabilitation of a domestic cat presenting a compressive L1-L5 fracture. Bone marrow cells collected by puncture of the iliac crest were cultured to obtain mesenchymal stem cells three weeks before surgery. Hemilaminectomy was performed, followed by injection of the mesenchymal stem cells in the injured area. Clinical evaluation of the animal prior to surgery showed absence of pain, muscular tonus, and panniculi reflexes. Seven days after surgery and cell transplantation the examination revealed a progressive recovery of the panniculus reflexes and of the responses to superficial and deep pain stimuli despite the low proprioceptive and hyperreflexic ataxic hind limbs. Physiotherapy protocols were applied for clinical rehabilitation after surgery. The cat's first steps, three-minute weight-bearing, and intestine and urinary bladder partial reestablishment were observed 75 days post-surgery. Our results indicate the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injuries.

Keywords: Domestic cat, Mesenchymal stem cells, Cellular therapy, Rehabilitation, Spinal cord injury

Introduction

The mammalian central nervous system presents a low capacity of axonal regeneration after being injured (1), possibly due to the inability of neural cells of self-rebuilding its functional structure in severe lesions (2). A considerable effort has been made to assess the therapeutic potential and biological principles of stem cell therapy for

degenerative and traumatic disorders. Stem cells have the ability of self-renewing and differentiating into specialized cells. Among the sources of stem cells, the bone marrow is the most extensively investigated. Bone marrow cells are easy to obtain and can differentiate into neurons in vitro (3) and in vivo (4).

Spinal cord injury in mammals, such as domestic cats, results in the loss of neurons and axonal degeneration at the lesion site. The process leads to severe functional impairment, paraplegia, or tetraplegia. Transplantation of different types of stem cells improved functional recovery after spinal cord injury in rodents and primates (5, 6). The beneficial effects appear to be mediated by several mechanisms, including replacement of lost cells and secretion of neurotrophic factors. Most importantly, the generation of

Accepted for publication August 9, 2012

Correspondence to **Milena Botelho Pereira Soares**

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 121, Rua Waldemar Falcão, Candeal-Salvador-Bahia-Brazil, 40296-710. Tel: +55-71-3176-2260, Fax: +55-71-3176-2272 E-mail: milena@bahia.fiocruz.br

oligodendrocytes that remyelinate spared axons in the vicinity of a lesion is believed to be the main mechanism of functional recovery (7).

The present report describes the use of autologous mesenchymal stem cells associated with surgery and physiotherapy in the clinical rehabilitation of a domestic cat with a chronic spinal cord injury. Apart from being an important achievement for Veterinary Medicine, stem cell transplantation developed for the treatment in spinal cord lesions in cats can also serve as a basis for studies of similar conditions in human patients.

Materials and Methods

Animal selection

Felis catus, 1.5 years old, male, hit by a car at the age of four months. An informed written consent was obtained from the cat's owner and the procedures were carried out observing the welfare guidelines of the Federal Council of Veterinary Medicine of Brazil.

Clinical evaluation and imaging

For the clinical examinations we used a haemostatic halsted tweezer to verify responses to deep and superficial pain and panniculi reflexes and an orthopedic rubber hammer to test the patellar and ischiatic nerve reflexes. Myelography was performed after trichotomy of the area from proximal occipital bone to distal 4th cervical vertebrae, surgical anti-sepsis, and intrathecal administration of contrast media (0.45 ml/kg; Ominipaque[®] 300, Sanofi, São Paulo, Brazil) between cervical 1st (C1) and cervical 2nd (C2) vertebrae with a 22 gauge needle. The images were obtained with a 100 mA X-ray machine (Brasmed, São Paulo, Brazil) in lateral and ventro-dorsal views 5, 15, 30, and 60 minutes after contrast infusion. Helical computed tomography (Prospect, GE, São Paulo, Brazil) was performed with the animal in anesthetic plane (induction with 6 ml/kg propofol IV and maintenance with iso-fluorane; Cristália, São Paulo, Brazil) monitored throughout the procedure with a vital multi parameters device (SurgiVet[®] Advisor[®] multi-parameter monitor, Waukesha, WI, USA). Two-mm slices from thoracic 11th to lumbar 5th vertebrae were obtained. Reconstructions were performed with DICOM Medical Imaging Software (DiCom Software Inc., Orlando, FL, USA).

Collection of bone marrow cells and mesenchymal stem cell culture

Two ml of bone marrow were aspirated through a puncture of the iliac crest. The mesenchymal stem cells were

separated by plastic adherence and cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) containing 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and incubated in a humidified atmosphere at 37° C and 5% CO₂. The media was changed every three days until 80% of confluence was achieved. Passages were done by incubation of cell cultures with 0.25% trypsin/1 mM EDTA (Sigma, St Louis, MO, USA) for in vitro expansion. Multipotency of mesenchymal stem cell cultures was confirmed by induction of adipogenic and osteogenic differentiation (data not shown).

Surgery and cell transplantation

After antisepsis and anesthesia procedures, left dorsal hemilaminectomy from L1 to L4 was performed. Prior to the application of the cells, the injured area was treated with 0.5 ml dimethylsulfoxide (Sigma) 10% in saline. The suspension of previously cultured autologous mesenchymal stem cells (7×10^8 cells) was mixed to a liquefied type I collagen solution at 37°C and maintained in water-bath at 37°C until being applied within and over the injured area of the spinal cord with a 25 gauge needle. The lesion was covered with paravertebral autologous fat tissue. The surgical synthesis was performed as standard procedure and a thoracic shelter bandage was applied.

Physiotherapy protocol

Physiotherapy of the cat was started after the normal hematological and biochemical parameters of renal and hepatic function were obtained. The protocol included fascias unstuck and connective tissue of dorsal pelvic release; lymphatic drainage; muscle stimulation in tail; work of muscle power; replacement of the animal in quadruped position with manual stimulation of the endplate; sequential kinesiotherapy of the joints of limb pelvic; performance of different groups of exercises, always trying to achieve active movement, initially reflective reflex, use of ball and a sequence of exercises targeting proprioception; reeducation of movement represented by the working muscle, and daily reexamination of all therapeutical procedures throughout the entire process, respecting the natural joint sequence, beginning proximally and ending distally, at final time, use of electric FES (Functional Electrical Stimulation) waves to improve muscle strength and the organization of responses already achieved. The physical care for two months has been intensive (2 hours long) and twice a day, followed by a reduced protocol (one hour daily during 3 months).

Results and Discussion

After being hit by a car, eight months before surgery, the animal was diagnosed as having a compressive spinal fracture from lumbar 1st (L1) to lumbar 4th (L4) vertebrae (Fig. 1). Neurological findings included absence of superficial and deep pain (Fig. 2A). Just remove the words: 'supplementary material', muscular tonus and panniculus reflexes from the lesion area to the nail edge of both pelvic limbs. Tenesmus in bladder and bowels was also observed, and massage to defecate and urinate was necessary. After vertebral ankylosis confirmation by simple radiographic exam, a myelographic exam was performed, showing a partial obstruction of spinal space, with multiple medullar gap areas one hour after contrast injection (Fig. 1).

No medullar reflexes were present before and during the next four post-operative days, including superficial and deep nociception reflexes. By the seventh day, however, a progressive recovery of the panniculus reflex (Fig. 2B~D) and superficial and deep pain were observed, although proprioceptive reflexes and hyperreflexic ataxic hind limb movement responses remained low. The first steps and a three minutes weight bearing were observed at 75 days post-surgery (Fig. 2E, F). The movement progression began slowly, albeit in a constant way, for three months, and the progression in weight bearing seemed to have stagnated after that period. These recovery findings occurred simultaneously with the partial re-establishment of intestine and urinary bladder functions.

The findings of motor hind limb recovery corroborate to the ones reported previously, showing hind limb movement partial recovery in a study using a mouse model of spinal cord injury (8). Hofstetter and colleagues (9) found similar clinical results in comparison with histologic findings of spinal cord injury regeneration. In fact, electrical and histological regeneration of neuronal tissue by stem cells has been described before (3). On the other hand, structural neuronal tissue renovation was already obtained

without functional improvement (10). A partial recovery of pelvic limbs has been obtained with physiotherapeutic protocols following spinal cord lesions in rats (11-13).

A previous report showed that, in animals submitted to traumatic spinal cord lesions, there was no neurological recovery when compression lasted six hours or more (14). This finding reinforces the idea that no gain of function should be expected with the cat of this report only with the surgical management, since the compression in this case lasted eight months.

Zurita and Vaquero (15) investigated the effects of bone marrow stromal cell transplantation in a model of spinal cord injury induced by a trauma in rats, and also found beneficial effects of bone marrow stromal cells in this model of chronic spinal cord injury, showing an improvement of motor activity using the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale. Akiyama et al. (16) have shown that neuronal remyelination was the major effect of bone marrow stromal cell therapy in the spinal cord of rats. Several cell types may play a role in the regeneration of the spinal cord. Some of these cells appear to give rise to a substantial proportion of scar-forming astrocytes, as well as to an increase in the number of myelinating oligodendrocytes after spinal cord injury, and could play a central role in its repair (17, 18). Although it has been reported that adult bone marrow stromal stem cells express germ-line, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis (19), it is likely that the main mechanism by which these cells exert a protective effect during brain or spinal cord injuries is by a paracrine effect (20).

A contrast-enhanced computed tomography was performed 90 days after surgery and showed a remaining compression area at L3 level (Fig. 3). Compression is cited in veterinary literature as the major cause of neurological deficit after traumatic injuries (1). Thus, one of the possible causes of the clinical benefits stagnation observed three months after administration of stem cells could be due to this remaining compressive lesion in the spinal

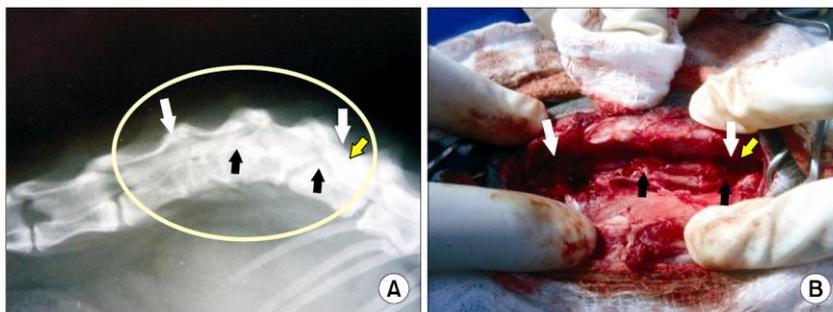


Fig. 1. Myelographic (A) and macroscopic surgical (B) images of damaged spine of a cat. A compressive lesion can be seen from lumbar 1st to lumbar 4th vertebrae (delimited area in A pointed out by the white arrows). A preserved area shows a macroscopic normal medullar aspect caudally to L1 vertebrae (red arrow). The two most severe compressed spine areas are indicated by the blue arrows.

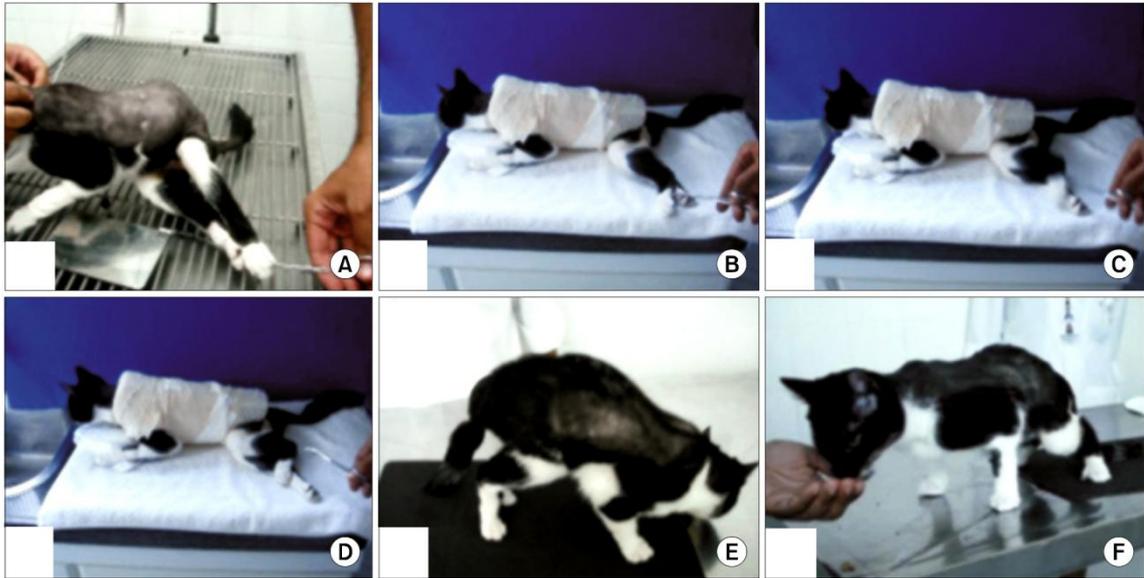


Fig. 2. Cat with areflexive pelvic limb during pre-surgical examination (A) and its clinical evolution 7 days post-surgery (B), with the same stimuli performed in A. Response of the cat with hind limb traction (C) and (D) 7 days after surgery and cell transplantation. Weight-bearing posture of the cat 70 days after surgery and cell transplantation (E) and (F). In images (B~D) the patient is wearing a protective bandage over the surgical incision.

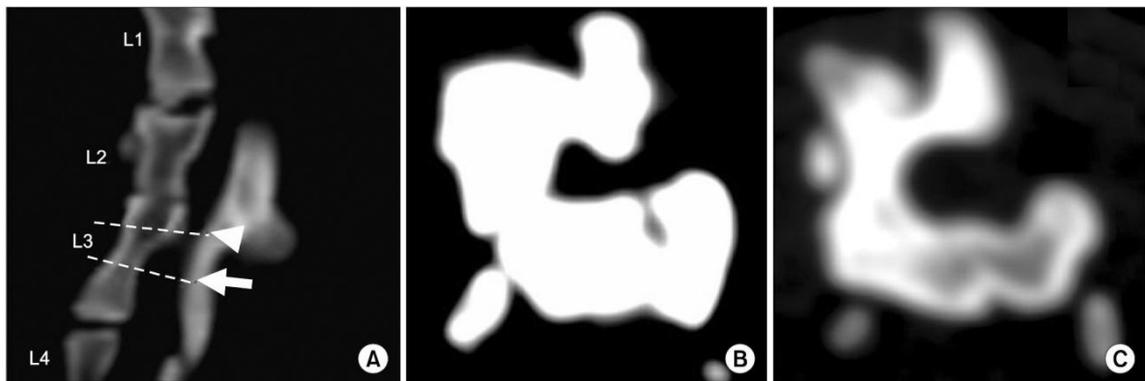


Fig. 3. Reconstructed computed tomography (A) and two axial images of a normal, not compressed spine area (B) and a still remaining compression area in lumbar 3rd vertebrae (C). The arrow and the arrowhead in (A) are the corresponding axial images in (B) and (C), with medullar areas of 0.4 cm² and 0.2 cm², respectively.

cord.

To our knowledge, this is the first study showing functional improvement in cats with chronic spinal cord injury which underwent stem cell transplantation. The pathways of gait improvement in this case study, such as the remodeling of anatomical structures with remyelination pattern induced by stem cells and the relearning of the nail movements and other muscles usage by physiotherapy techni-

ques, still need further investigation.

The clinical results of gradual functional response observed in the urinary bladder, smooth intestinal and striated hind limb skeletal musculature presented herein are believed to be a result of at least a partial substitution of damaged tissue by a functional one, even with a remaining spinal cord compression in the L3 area. Given the multifactorial aspects of the clinical improvement showed in

the present report, a long term study with more animals has been initiated using other neurodiagnostic tools, including the evaluation of evoked potential and nuclear magnetic resonance imaging before and after treatment.

As a clinical case report, we bring to discussion the progress obtained after the utilization of a conjunct of therapeutic methods, which included autologous stem cell transplantation, aiming to functionally recover the affected areas. Although no histopathologic study has been performed in this case, we hypothesize that without any structural earn, no functional gain is possible. In our short case study, we have shown a significant functional clinical improvement in a cat's spinal cord lesion treated with stem cell application followed by physiotherapy.

Acknowledgements

This work was supported by RENORBIO, CNPq, FINEP, and FAPESB.

Potential conflict of interest

The authors have no conflicting financial interest.

References

- Bregman BS, Goldberger ME. Infant lesion effect: II. Sparing and recovery of function after spinal cord damage in newborn and adult cats. *Brain Res* 1983;285:119-135
- Pluchino S, Zanotti L, Deleidi M, Martino G. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;215:211-219
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364-370
- Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova G, Lange D, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1364-1369
- Barnabé-Heider F, Frisé J. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* 2008;3:16-24
- Deng YB, Liu XG, Liu ZG, Liu XL, Liu Y, Zhou GQ. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytherapy* 2006;8:210-214
- Enzmann GU, Benton RL, Talbott JF, Cao Q, Whittemore SR. Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. *J Neurotrauma* 2006;23:479-495
- Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Katoh H, Iwamoto Y, Nakamura M, Miyoshi H, Okano HJ, Contag CH, Toyama Y, Okano H. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J* 2005;19:1839-1841
- Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, EL Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2199-2204
- Macias MY, Syring MB, Pizzi MA. Pain with no gain: Allodynia following neural stem cell transplantation in spinal cord injury. *Exp Neurol* 2006;201:335-348
- Lankhorst AJ, ter Laak MP, van Laar TJ, van Meeteren NL, de Groot JC, Schrama LH, Harmers, FP, Gispén, WH. Effects of enriched housing on functional recovery after spinal cord contusive injury in the adult rat. *J Neurotrauma* 2001;18:203-215
- Van Meeteren NL, Eggers R, Lankhorst AJ, Gispén WH, Hamers FP. Locomotor recovery after spinal cord contusion injury in rats is improved by spontaneous exercise. *J Neurotrauma* 2003;20:1029-1037
- Hutchinson KJ, Gomez-Pinilla F, Crowe MJ, Ying Z, Basso DM. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* 2004;127:1403-1414
- Delamarter RB, Sherman J, Carr JB. Pathophysiology of spinal cord injury. Recovery after immediate and delayed decompression. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1042-1049
- Zurita M, Vaquero J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett* 2006;402:51-56
- Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci* 2002;22:6623-6630
- Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisé J. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 2008;6:1494-1507
- Hawryluk GW, Fehlings MG. The center of the spinal cord may be central to its repair. *Cell Stem Cell* 2008;3:230-232
- Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cell express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 2002;96:908-917
- Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;24:59-64

6 MANUSCRITO III

O terceiro manuscrito intitulado: “Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs” descreve os resultados clínicos dos casos de cães tratados pelo projeto. O artigo foi submetido e aceito para publicação na revista Stem Cells International em 25 de fevereiro de 2014 (<http://dx.doi.org/10.1155/2014/437521>).

Research Article

Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow for the Treatment of Naturally Injured Spinal Cord in Dogs

Euler Moraes Penha,^{1,2} Cássio Santana Meira,¹ Elisalva Teixeira Guimarães,^{1,3} Marcus Vinícius Pinheiro Mendonça,⁴ Faye Alice Gravelly,⁵ Cláudia Maria Bahia Pinheiro,⁶ Taiana Maria Bahia Pinheiro,⁶ Stella Maria Barrouin-Melo,² Ricardo Ribeiro-dos-Santos,⁷ and Milena Botelho Pereira Soares^{1,7}

¹ Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 40296-710 Salvador, BA, Brazil

² Hospital de Medicina Veterinária, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 40170-110 Salvador, BA, Brazil

³ Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, 41150-000 Salvador, BA, Brazil

⁴ Hospital Espanhol, 40140-110 Salvador, BA, Brazil

⁵ A Arca Veterinária, 40243-045 Salvador, BA, Brazil

⁶ Estácio-FIB, Centro Universitário Estácio da Bahia, 41770-030 Salvador, BA, Brazil

⁷ Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, 41253-190 Salvador, BA, Brazil

Correspondence should be addressed to Milena Botelho Pereira Soares; milenabpsoares@gmail.com

Received 15 September 2013; Accepted 16 January 2014; Published 25 February 2014

Academic Editor: Eva Mezey

Copyright © 2014 Euler Moraes Penha et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The use of stem cells in injury repair has been extensively investigated. Here, we examined the therapeutic effects of autologous bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) transplantation in four dogs with natural traumatic spinal cord injuries. MSC were cultured *in vitro*, and proliferation rate and cell viability were evaluated. Cell suspensions were prepared and surgically administered into the spinal cord. The animals were clinically evaluated and examined by nuclear magnetic resonance. Ten days after the surgical procedure and MSC transplantation, we observed a progressive recovery of the panniculus reflex and diminished superficial and deep pain response, although there were still low proprioceptive reflexes in addition to a hyperreflex in the ataxic hind limb movement responses. Each dog demonstrated an improvement in these gains over time. Conscious reflex recovery occurred simultaneously with moderate improvement in intestine and urinary bladder functions in two of the four dogs. By the 18th month of clinical monitoring, we observed a remarkable clinical amelioration accompanied by improved movement, in three of the four dogs. However, no clinical gain was associated with alterations in magnetic resonance imaging. Our results indicate that MSC are potential candidates for the stem cell therapy following spinal cord injury.

1. Introduction

Traumatic spinal cord injury (SCI) has become a more frequent condition, with an annual worldwide incidence of 15 to 40 cases per million [1]. SCI has a major negative impact on functional, medical, and financial aspects of the injured person, as well as deleterious effect on the individual's

psychosocial well-being [2–4]. The pathophysiology of SCI is determined not only by the initial mechanical insult but also by secondary processes, which include ischemia, anoxia, free-radical formation, and cytotoxicity that can occur in the immediate hours to days following injury. Lesion evolution following SCI involves neuronal death by both necrosis and apoptosis [5], and since regeneration of

the central nervous system is limited after injuries, it is crucial to develop novel approaches that optimize functional recovery after SCI. Potential therapies may include strategies to reduce the progression of secondary injuries, modulate the microenvironment of the spinal cord, remyelination and improve the intrinsic regenerative potential of endogenous progenitor cells [6].

Recently, cell transplantation has been considered a promising option for the treatment of neuronal disorders [7], including spinal cord lesions [8–10]. The initial pioneering studies most frequently involved neural stem cells as the desired cell source explored for regeneration of nervous system [11]. However, due to their limited availability, alternative sources for neural cell transplantation, such as embryonic, bone marrow, adipose, and umbilical cord blood stem cells, have also been investigated [7, 9, 12–16]. The cells obtained from these additional sources have been shown to survive, proliferate, migrate, and differentiate into neuronal phenotypes in the damaged brain and spinal cord [8, 17–19]. Despite positive results obtained in experimental models using a variety of animal species and recent dramatic progress in cellular transplantation, development of powerful strategies to treat SCI remains a major clinical challenge [8, 20].

Naturally, injured dogs are considered excellent models for the comparative study and comprehension of human diseases, which includes nervous system pathologies, due to the fact that they present similar anatomical, physiological, and immunological characteristics. Dogs and humans share innumerable genetic, traumatic, infectious, and metabolic diseases. The most prevalent causes of spinal cord lesion in dogs are car accidents and degenerative disk diseases, occurring at or near the thoracolumbar junction and producing chronic, complete paraplegia [21]. The damaged disks can burst or bulge and exert pressure on the delicate spinal cord, interrupting the spinal blood supply and is considered a traumatic SCI that induces a wide range of pathological events, generally resulting in a permanent state of sensory and motor loss [22, 23]. In addition to these well-described pathological alterations, traumatic SCI can cause severe deficits within the urogenital system [24, 25] and can include conditions that are both chronic and potentially life-threatening as well as cause a significant reduction in human quality of life [26] and in companion animals [21, 27, 28].

Currently there is no consensual medical therapy standard for the treatment of spinal cord injury in dogs. Practiced medical therapies aim to control secondary injury mechanisms (e.g., free radical scavenging) that occur following the primary injury insult. No satisfactory curative therapy has been accepted for chronic cases in both dogs and humans.

In the present study, we have isolated and cultivated *in vitro* MSC obtained from bone marrow of dogs suffering from chronic SCI due to degenerative disc disease. These primary adult mesenchymal stem cell cultures were characterized and applied within the injured spinal cord. The animals were clinically monitored during 18 months for safety and evaluation of the cell therapy efficacy.

TABLE 1: Characteristics of dogs submitted to MSC therapy.

Dog	Age (years)	Sex	Lesion length	Lesion level
1	2	Female	9 mm	T13-L1
2	4	Male	12 mm	L1-L3
3	3	Male	10 mm	L1-L3
4	2	Male	30 mm	L1-L7

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Ethics. Following a formal agreement with the animal owners, implementation of welfare observation, and biological security protocols, 12 dogs presenting spinal cord compression due to herniated intervertebral disks (T12 to L5 vertebrae) were submitted to decompressive surgery (hemilaminectomy). Eight animals presented motor gains during follow-up evaluations. Four adult dogs presenting chronic unfavorable follow-up evaluations (no neurological gain for 6 months after surgery) were included in this study (Table 1). Animals were subjected to physical therapy and clinical evaluation for 6 months prior to and during the 12 months following MSC administration. All dogs were scored according to the degree of clinical neurological dysfunction and by nuclear magnetic resonance at two time points: (1) day of cell transplantation and (2) at the conclusion of the follow-up evaluation (18 months). A radiographic exam was performed in order to confirm the location of spinal cord lesion and to exclude other diseases.

All animal procedures performed were in accordance with guidelines defined by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the HSR—CEUA, Bahia, Brazil, and in agreement with ethical publications [21, 28].

2.2. Bone Marrow Isolation and Cell Culture. Bone marrow aspiration in dogs was performed by puncturing the iliac crest under sedation with diazepam (0.5 mg/kg/iv) associated with tramadol hydrochloride (1.0 mg/kg/iv) in lateral decubitus. After shaving and asepsis at the site for puncture, 0.5 to 1.0 mL of bone marrow was collected in previously heparinized syringes. Collected samples were diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA), and the fraction with mononuclear cells was obtained by Ficoll-Hypaque gradient (Sigma, St Louis, MO, USA), after centrifugation at $400 \times g$ for 30 minutes at 20°C . The interface containing mononuclear cells was collected in individualized tubes and washed twice in incomplete DMEM. The cells were cultured, as previously described [29, 30]. Briefly, mononuclear cells were resuspended in DMEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin, and 10% fetal bovine serum (all reagents were purchased from Sigma) and cultured at the density of 10^5 cells/cm² in polystyrene plates. Cell cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂. When 80% confluence was reached, cells were detached using 0.25% trypsin (Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and expanded in new culture bottles (9×10^3 cells/cm²). The cells were expanded during approximately 5 to 10 passages

TABLE 2: Summary of clinical and imaging findings in dogs submitted to MSC.

(a)

Clinical findings	Dog 1			Dog 2			Dog 3			Dog 4		
	Before MSC	100 d	12 mo	Before MSC	100 d	12 mo	Before MSC	100 d	12 mo	Before MSC	100 d	12 mo
Tail movement	(-)	(-)	Partial gain	(-)	Total gain	Total gain	(-)	(-)	Partial gain	(-)	(-)	(-)
Panicculi reflex	(-)	Partial gain	Partial gain	(-)	(-)	Partial gain	(-)	Partial gain	Partial gain	(-)	Partial gain	Partial gain
Urinary bladder continence	(-)	Partial gain	Partial gain	(-)	Partial gain	Partial gain	(-)	Partial gain	(-)	(-)	(-)	(-)
Propioci. Reflex	(-)	Partial gain	Partial gain	(-)	Partial gain	Partial gain	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Weight bearing	(-)	(-)	(-)	(-)	1 min	1 min	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(b)

	Before MSC	12 mo						
MFS	0	1	0	1	0	0	0	0
	Before MSC	18 mo						
Rx	0	0	0	0	0	0	0	0

Before MSC: before administration of MSC; 100 d: 100 days after MSC transplantation; 12 mo: 12 months after MSC transplantation; MFS: modified Frankel score; propioci. proprioception; Rx: radiogram evaluation (0: neither proliferative/erosive observations nor fracture/luxation of the spine; 1: presence of signs of proliferative/erosive alterations or fracture/luxation of the spine).

TABLE 3: Summary results from magnetic resonance imaging.

MRI imaging	DOG 1		DOG 2		DOG 3		DOG 4	
	Before MSC	12 months after MSC						
	Increased	Unchanged	Increased	Unchanged	Increased	Increased and ESC	Increased	H/S

Increased: increased signal intensity; ESC: extradural synovial cyst; H/S: hydromyelia/syringomyelia.

and aliquots were frozen to be utilized in different stages. Cell viability was determined by trypan blue exclusion test.

2.3. Proliferation Assay. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) assay (Invitrogen/Molecular Probes) was performed according to methodology described previously [31], following the manufacturer instructions. Acquisition and analysis were conducted using a FACScalibur cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) with CellQuest software. A minimum of 50,000 events were collected.

2.4. Differentiation Assays. The potential to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages was examined. To promote osteogenesis, the cells were incubated with DMEM, supplemented with 10 mM β -glycerol phosphate (Sigma), 0.05 mM ascorbate-2-phosphate (Sigma), and 100 nM dexamethasone (Sigma). The culture medium was changed two times per week for up to three weeks. To detect calcium, the cells were fixed with methanol for 10 minutes at room

temperature and stained with alizarin red at pH 4.0 for 5 minutes at room temperature. For adipogenesis, cultured cells were incubated in adipogenic medium that included DMEM, supplemented with 60 mM indomethacin (Sigma), 0.5 mM hydrocortisone (Sigma), and 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma). The culture medium was changed two times per week for up to three weeks. The cells then were fixed in methanol for 45 minutes and stained with Oil Red (Sigma) for detection of lipid accumulation.

2.5. Clinical Evaluation. The dogs were clinically, radiographically, and by nuclear magnetic resonance imaging (MRI) evaluated before and after the cell transplantation (Figure 1, Tables 2 and 3). Prior to surgery, different degrees of superficial and deep pain deficit, muscular tone, and panniculus reflexes from the lesioned area to the nail edge of both caudal limbs were observed. Physical exams were performed according to [28]. The observed clinical signs were (a) patellar and sciatic reflexes; (b) dorsal panniculus reflex; (c) pain reflex; and (d) anterior and posterior weight bearing limbs. Conscious proprioception was the first test to be performed

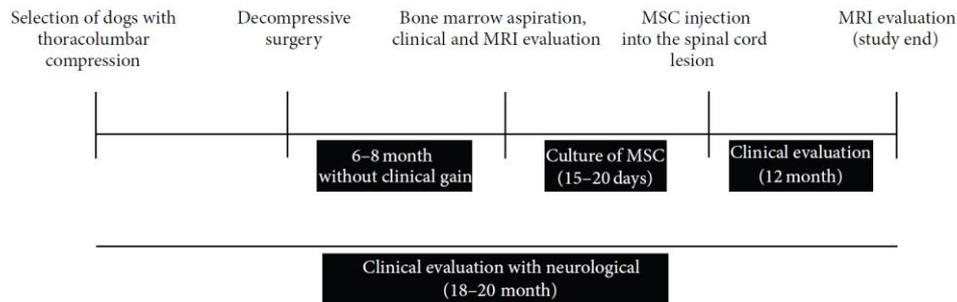


FIGURE 1: Data acquisition schematic and methods.

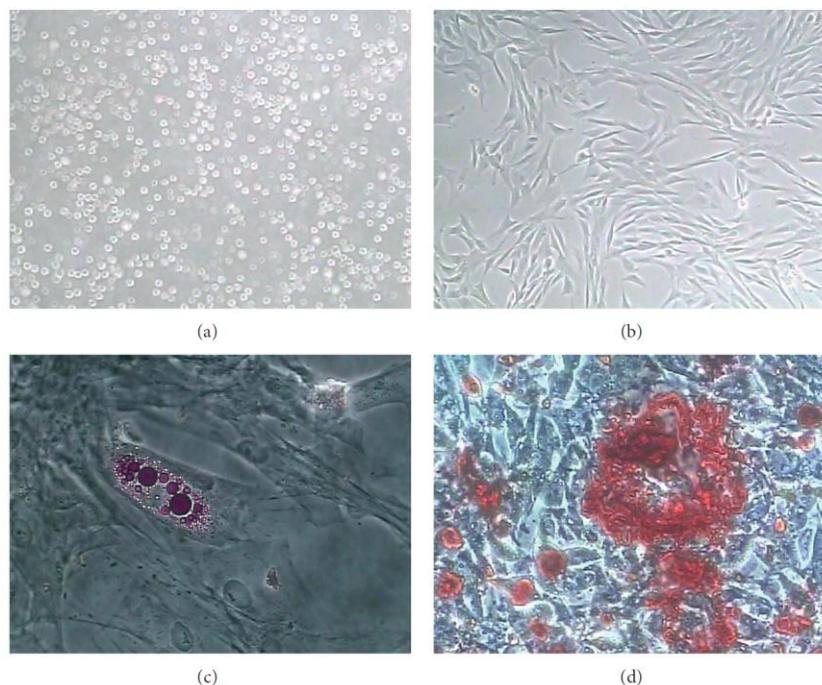


FIGURE 2: Collection, culture, differentiation, and application of dog bone marrow mesenchymal stem cells (MSC), in dog 2. (a) and (b) control cell cultures in noninducing medium. (a) Day one of a first passage culture. (b) Cell confluence after 15 days of culture. (c) Adipogenic differentiation; Oil red staining showing cytoplasmic fat granuli inside cells. (d) Osteogenic differentiation. Alizarin red staining showing mineralized matrix deposition within stem cells. Magnification: (a) and (b) 100X; (c) and (d) 400X.

by inverting each paw, one at a time, so that the animal was standing upon the dorsum of the foot and was classified as “positive” when the animal almost immediately repositioned the foot to the normal position and “negative” when it did not respond within 15 seconds.

Superficial pain was tested by pinching the webbing between the toes, while deep pain was tested by clamping a 16 cm universal hemostat on the joints of the digits to periosteum stimulation, where limb withdrawal represented the expected spinal reflex. Stimulation of the lateral spinothalamic tract and subsequent transfer of information to the cerebral cortex should result in a behavioral response, such

as crying, snapping or changing position, or autonomic activities. If one or more of these behavioral responses were observed, it was classified as deficiency of pain.

Reflex examinations were performed with the animal positioned on its side allowing for the muscle to be relaxed. The patellar tendon was then struck with a reflex hammer and the muscle reaction was observed. Both posterior limbs were checked, although the “free” or “up limb” was the only limb recorded. The reflexes were graded from 0 to 4 based upon the response: 0 = areflexia; 1 = diminished reflex; 2 = normal reflex; 3 = hyperactive reflex; and 4 = hyperactive reflex with clonus. The posterior limb reflexes tested were

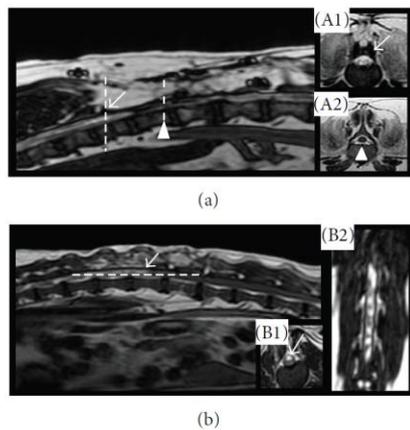


FIGURE 3: (a) MRI of a dog with syringomyelia (dog 4) showing area of hypersignal ((A1): white arrow) indicating spinal cord degeneration and an area void of spinal cord presence signal ((A2): arrow head). (b) MRI of a dog (dog 3) with a hypersignal (white arrow), indicating spinal cord degeneration also within axial (B1) and dorsal (B2) aspects regions.



FIGURE 4: First minute weight bearing of dog (dog 2) 100 days after surgery.

patellar (segments L4-L5); cranial tibialis (segments L6-S2), and sciatic notch (segments L6-S2).

Two other subjective criteria were also evaluated: tail movement and urinary bladder voluntary control. The neurological gain of both aspects was classified as “no,” “partial,” and “total” considering conscious movements of the tail and bladder continence. Neurologic function was characterized by use of a modified Frankel score (MFS; determined on a scale of 0 to 5, where 0 represented paraplegia with no deep nociception and 5 represented paraspinal hyperesthesia only) [32]. Long-term follow-up evaluations were later assessed.

Imaging Assessment. a nuclear magnetic resonance imaging (MRI equipment: magnetom aera 1.5T, Siemens, USA) evaluation was performed before MSC administration to evaluate the morphologic aspect of spinal cord. The acquisition was performed on anesthetized dogs that were positioned in dorsal recumbence with limbs flexed along the torso. T1, T2,

and short tau inversion recovery sequences were acquired by spin echo as well as by using the more rapid single shot fast spin echo and gradient echo pulse sequences. Three large overlapping fields of view (FOV) were used to visualize the thoracic-lumbar spine, which was compared to the sagittal and dorsal plane images.

2.6. Surgical Procedure and MSC Administration. Each animal underwent a second hemilaminectomy in the same location as the initial decompression surgery (before 6 months), under general anesthesia (induction: propofol 8.0 mg/kg, maintenance: 2.0 to 2.5% isoflurane with oxygen 100%) followed by autologous MSC therapy. Cell preparations with more than 96% of viability were used in the transplant. Initially, a 1.0 mL syringe with a 13 × 4.5 mm needle was used to inject DMSO (0.2 mL/cm³ of lesion) into the injured area. The administration of 10⁶ cells in each 1.0 cm³ of lesion was performed continuously along 5 mm of the central dorsal spine. Bovine collagen gelfoam (Pfizer, Portage, MI, USA) was used as a scaffold over the administration area to prevent cell escape.

2.7. Pain Control. The pain was controlled by the use of tramadol 2 mg/kg/TID for 4 days (Dorless V—Agener União, Pouso Alegre, Brazil) and meloxicam 0.2 mg/Kg prior to surgery and 0.1 mg/kg/SID for 5 days (Maxican—Ouro fino, Cravinho, Brazil), before and after surgery. The dogs were maintained and monitored in the hospital for 2 days and, according to individual needs, received an extra pharmacological pain relief and physical therapy, which included spine mobilization/manipulation, therapeutic exercise, neuromuscular reeducation, hot/cold packs, and electrical muscle stimulation. Active kinesiotherapy involved dog treadmill training.

3. Results

3.1. Morphological Features, Proliferation, Viability, and Differentiation of the Mesenchymal Bone Marrow Stem Culture Cells. Canine mesenchymal stem cells obtained from bone marrow were adherent to the polystyrene culture flasks and showed rapid expansion and proliferation after *in vitro* isolation. Each bone marrow aspiration procedure yielded on average 3.5×10^7 mononuclear cells. When maintained in culture, these cells presented fibroblast-like and rounded morphologies (Figure 2(a)). Cell confluence was obtained after 15 days of culture (Figure 2(b)). Quantitative evaluation of the exponential cell expansion phase was estimated by CFSE staining. Approximately, 80% of the canine MSC proliferated after 24 hours of culture (Figure 2(a)). In addition, MSC presented differentiation potential to form osteocytes and adipocytes after two weeks of culture using specific differentiation induction mediums (Figures 2(c) and 2(d)).

3.2. Clinical Findings. Neurological recovery after the decompression varied greatly, being inversely proportional to the duration of compression. We observed low to absent neurological recovery after 72 hours of compression and

no degree of recovery after 96 hours of compression. Dogs displaying significant neurological recovery 6 months after surgery were not submitted to cell therapy.

Regarding the dogs that underwent cell therapy, from the first to the ninth day after MSC transplantation, we did not observe differences in the state of the medullar reflexes, including superficial and deep nociception reflexes, in comparison to the clinical condition of all four dogs before the intervention. On the 10th day, however, a progressive recovery of panniculus reflex and superficial and deep pain were observed, despite the fact that proprioceptive reflexes and hyperreflexive ataxic hind limb movement responses remained reduced. Over time, there was an improvement in the gains of these reflexes (Table 2). Dog 3 presented syringomyelia prior to MSC transplantation (Figure 3(a)) in the 1st to 6th lumbar vertebrae and demonstrated poor recuperation, with only a discrete panniculus reflex recovery. Dog 2 had a less compressive lesion and demonstrated a hypersignal at the 3rd lumbar (Figure 3(b)). Following MSC therapy, dog 2 was able to sustain a complete weight bearing position for one minute, 100 days after surgery (Figure 4).

These recovery findings occurred simultaneously with the reestablishment of bowel and urinary bladder functions in dogs 1 and 2. Despite slow movement progression, constant improvement was observed over the next 3 months. Complete and partial self-controlled tail movement was observed in dog 1 and dog 3, respectively. After 6 months of transplantation, no additional clinical gains were observed. Dogs 3 and 4 remained with recurring urinary bladder dysfunction and infection due to the incapacity of the weight bearing position, with no observed gains, according to MFS (Table 2) [32].

3.3. MRI Evaluation. The MRI diagnosis provided visualization of the entire injured spine, including the vertebral bodies, intervertebral discs, vertebral canal, and spinal cord (Figure 3). The remaining disorders included intervertebral disc degeneration (without compressive intervertebral disk protrusions/extrusion or relevant clinical signals) in three dogs (two cervical and one lumbar). All dogs presented areas of hyperintensity of the spinal cord, greater than or equal to the length of the L2 vertebral body, in T2-weighted magnetic resonance images. Neither mass lesions nor nerve root tumors were observed. One dog presented hydromyelia/syringomyelia (dog 4) and another was identified to have an extradural synovial cyst (Table 3) (dog 3). Extradural compressive lesions were neither detected before nor after cell therapy. Data generated by MRI revealed no changes at the MSC administration site into the spinal cord or within urinary bladder.

4. Discussion

The use of naturally diseased dogs is a very interesting option to develop cell-based regenerative strategies, since most canine diseases are functionally and structurally quite similar to those described in humans [15]. In the present study, we evaluated the potential of autologous MSC transplantation to regenerate canine injured spinal cord. We observed that

MSC presented *in vitro* properties are quite similar to those observed in humans [33] and other species of laboratory animals [7, 17, 30, 33, 34]. Cultured MSC showed osteogenic and adipogenic differentiation properties and high proliferation indexes, which emphasize the feasibility of its use for therapeutic directive, including the treatment of neurologic disorders [6–10].

Engrafted cells may be a source of necessary secretory factors that counteract the inhibition caused by glial cells and maximize the intrinsic regenerative potential of endogenous progenitor cells. It has been reported that some factors secreted by mesenchymal stem cells support neural differentiation of embryonic stem cells [35]. Since neural progenitor cells express a wide variety of chemokine receptors and migration-related proteins that could potentially influence progenitor cell migration, neurogenesis, and gliogenesis [9], it is possible that, at least in part, the clinical improvements shown by the dogs in the present study can be justified by the interaction between engrafted MSC and endogenous spinal cord-derived factors.

Another potential approach aiming to minimize the progression of secondary injury can be achieved by modulating the neuroinhibitory environment of the spinal cord. It is hypothesized that the application of a scaffold in the surgical wound may avoid scarring and subsequent cyst formation. The mechanism for this is not yet known, but it has been associated with controlling the exaggerated cellular growth by a programmed structure, such as a “net,” where the cells can grow and proliferate [8]. Inflammation-mediated lesion expansion has been correlated with the secondary injury processes [5], where the lesion size is speculated to be correlated with the degree of functional deficit [36]. During the surgical procedure, after applying MSC, we used collagen gel as a scaffold, acting as a biodegradable composite with the purpose to secure the cells within the injured area. However, our purpose was not to anatomically reconstruct the surgical site, as previously reported [8].

Dogs are prone to autoimmune diseases which can be provoked by the introduction of foreign proteins like FCS or FBS-derived molecules. In some cases, immunological reactions and anti-FBS antibodies have been observed and considered to affect the therapeutic outcome [37]. Thus, although in our study we did not observe any immune-mediated reaction in our dogs, alternative supplements could be used for late comparisons with FBS for MSC isolation and expansion. Previously, researches [38] indicate that thrombin-activated platelet releasate plasma and pooled platelet lysate supplements support the isolation and expansion of MSC compared to FBS.

The dogs in the present study presented a faster clinical outcome/recovery in the first 100 days following cell transplantation, but some recovery signs were still observed up to the 18th month of clinical monitoring in each animal. The continuous progression included improvement of the cutaneous trunci muscle reflex on the back skin; however, some recoveries of reflexes that occurred faster in the initial stages were not observed at the end of the 12-month period. This suggests that the major clinical benefits seen following

stem cell therapy were due to factor(s) secreted by MSC in a discontinuous manner that have yet to be identified.

Urogenital disorders secondary to SCI include disruption of supraspinal input, afferent input to spinal cord, and reorganization of intraspinal circuitry in response to injury [24–26]. As a result, in most cases, bladder control is partially achieved only if decompression is performed shortly following a severe spinal cord compression in dogs [39]. Previous efforts to restore bladder function, including nerve transplantation, were not successful despite low control over the reinnervation and thus coordinating voiding [40]. In the present work, the clinical improvements in bladder control observed in two dogs were not associated with gain in spinal cord MRI images, which also were sustained throughout the entire recovery period. Two years after transplantation, the clinical bladder gain showed limited improvements and was not associated with any observable long- or short-term complications.

The dogs included in the present study had chronic paraplegia secondary to intervertebral disk herniation and were not expected to regain a normal gait with any other known treatment. Unfortunately, the lack of muscle control was not enough to insure that the canine patients would walk again. One of the largest differences between dogs and human with respect to self-standing remains in locomotion expectations. A smooth diminishing on hypointense areas was observed within SCI by MRI, showing no counter indication of the technique; however, following cell therapy, no imaging benefits were observed by this exam. Using cell therapy in these types of clinical cases has some limitations, as histological data from the spinal cord cannot be generated and therefore direct conclusions regarding tissue benefits and improvements cannot be made.

5. Conclusion

In conclusion, bone marrow-derived MSC collecting and administration protocols were safe and relatively simple for therapy of spinal cord injury in dogs. Cell therapy with autologous bone marrow within the injured spinal cord in dogs produced some clear clinical benefits to the animals. Although feasible results were reached, more research is still required for clinical practice and additional research is necessary to standardize the application.

Conflict of Interests

The authors report no conflict of interests concerning the materials or methods used in this study or the findings specified in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Research Foundation of Bahia State (FAPESB) and Brazilian National Council for Research and Technological Development (CNPq). This work was supported by RENORBIO, FINEP, and MCT. The authors wish to thank Kyan J. Allahdadi for careful reviewing of the paper.

References

- [1] L. H. S. Sekhon and M. G. Fehlings, "Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury," *Spine*, vol. 26, no. 24, pp. S2–S12, 2001.
- [2] B. K. Go, M. J. DeVivo, and J. S. Richards, "The epidemiology of spinal cord injury," in *Spinal Cord Injury*, S. L. Stover, J. A. DeLisa, and G. G. Whiteneck, Eds., pp. 21–55, Aspen, Gaithersburg, Md, USA, 1995.
- [3] J. S. Krause, M. Sternberg, S. Lottes, and J. Maides, "Mortality after spinal cord injury: an 11-year prospective study," *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 78, no. 8, pp. 815–821, 1997.
- [4] M. J. DeVivo, "Epidemiology of traumatic spinal cord injury," in *Spinal Cord Medicine*, S. Kirshblum, D. I. Campagnolo, and J. A. DeLisa, Eds., pp. 69–81, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md, USA, 2002.
- [5] M. S. Beattie, A. A. Farooqui, and J. C. Bresnahan, "Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury," *Journal of Neurotrauma*, vol. 17, no. 10, pp. 915–925, 2000.
- [6] T. M. Myckatyn, S. E. Mackinnon, and J. W. McDonald, "Stem cell transplantation and other novel techniques for promoting recovery from spinal cord injury," *Transplant Immunology*, vol. 12, no. 3–4, pp. 343–358, 2004.
- [7] S. Pluchino, L. Zanotti, M. Deleidi, and G. Martino, "Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders," *Brain Research Reviews*, vol. 48, no. 2, pp. 211–219, 2005.
- [8] Y. D. Teng, E. B. Lavik, X. Qu et al., "Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no. 5, pp. 3024–3029, 2002.
- [9] S.-K. Kang, M.-J. Shin, J. S. Jung, Y. G. Kim, and C.-H. Kim, "Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury," *Stem Cells and Development*, vol. 15, no. 4, pp. 583–594, 2006.
- [10] H. S. Keirstead, G. Nistor, G. Bernal et al., "Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury," *Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 19, pp. 4694–4705, 2005.
- [11] A. Fine, "Transplantation of fetal cells and tissue: an overview," *Canadian Medical Association Journal*, vol. 151, no. 9, pp. 1261–1268, 1994.
- [12] S. Kadiyala, R. G. Young, M. A. Thiede, and S. P. Bruder, "Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro," *Cell Transplantation*, vol. 6, no. 2, pp. 125–134, 1997.
- [13] R. McKay, "Stem cells in the central nervous system," *Science*, vol. 276, no. 5309, pp. 66–71, 1997.
- [14] G. C. Kopen, D. J. Prockop, and D. G. Phinney, "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 19, pp. 10711–10716, 1999.
- [15] B. E. Petersen, W. C. Bowen, K. D. Patrene et al., "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells," *Science*, vol. 284, no. 5417, pp. 1168–1170, 1999.
- [16] J.-H. Lim, Y.-E. Byeon, H.-H. Ryu et al., "Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs," *Journal of Veterinary Science*, vol. 8, no. 3, pp. 275–282, 2007.

- [17] Y. Akiyama, C. Radtke, and J. D. Kocsis, "Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells," *Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 15, pp. 6623–6630, 2002.
- [18] A. E. M. Mautes, J. Liu, J. Brandewiede, J. Manville, E. Snyder, and M. Schachner, "Regional energy metabolism following short-term neural stem cell transplantation into the injured spinal cord," *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 24, no. 2, pp. 227–236, 2004.
- [19] Z. M. Zhao, H. J. Li, H. Y. Liu et al., "Intraspinal transplantation of CD34+ human umbilical cord blood cells after spinal cord hemisection injury improves functional recovery in adult rats," *Cell Transplantation*, vol. 13, no. 2, pp. 113–122, 2004.
- [20] A. Blesch, P. Lu, and M. H. Tuszynski, "Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair," *Brain Research Bulletin*, vol. 57, no. 6, pp. 833–838, 2002.
- [21] N. Olby, "Current concepts in the management of acute spinal cord injury," *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 399–407, 1999.
- [22] C. E. Hulsebosch, "Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury," *American Journal of Physiology*, vol. 26, no. 1–4, pp. 238–255, 2002.
- [23] M. D. Norenberg, J. Smith, and A. Marcillo, "The pathology of human spinal cord injury: defining the problems," *Journal of Neurotrauma*, vol. 21, no. 4, pp. 429–440, 2004.
- [24] M. D. Craggs, A. V. Balasubramaniam, E. A. L. Chung, and A. V. Emmanuel, "Aberrant reflexes and function of the pelvic organs following spinal cord injury in man," *Autonomic Neuroscience*, vol. 126–127, pp. 355–370, 2006.
- [25] G. Samson and D. D. Cardenas, "Neurogenic bladder in spinal cord injury," *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, vol. 18, no. 2, pp. 255–274, 2007.
- [26] J. J. Herrera, R. J. L. Haywood-Watson, and R. J. Grill, "Acute and chronic deficits in the urinary bladder after spinal contusion injury in the adult rat," *Journal of Neurotrauma*, vol. 27, no. 2, pp. 423–431, 2010.
- [27] N. J. Olby, T. Harris, J. Burr, K. Muñana, N. Sharp, and B. Keene, "Recovery of pelvic limb function in dogs following acute intervertebral disc herniations," *Journal of Neurotrauma*, vol. 21, no. 1, pp. 49–59, 2004.
- [28] N. J. H. Sharp and S. J. Wheeler, *Small Animal Spinal Disorders. Diagnosis and Surgery*, Elsevier Mosby, Edinburgh, UK, 2nd edition, 2005.
- [29] P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian et al., "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 13, no. 12, pp. 4279–4295, 2002.
- [30] W. Wagner, F. Wein, A. Seckinger et al., "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood," *Experimental Hematology*, vol. 33, no. 11, pp. 1402–1416, 2005.
- [31] H. Glimm and C. J. Eaves, "Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture," *Blood*, vol. 94, no. 7, pp. 2161–2168, 1999.
- [32] T. H. Witsberger, J. M. Levine, G. T. Fosgate et al., "Associations between cerebrospinal fluid biomarkers and long-term neurologic outcome in dogs with acute intervertebral disk herniation," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 240, no. 5, pp. 555–562, 2012.
- [33] Y. A. Romanov, A. N. Darevskaya, N. V. Merzlikina, and L. B. Buravkova, "Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities," *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 140, no. 1, pp. 138–143, 2005.
- [34] M. B. P. Soares, R. S. Lima, L. L. Rocha et al., "Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice," *American Journal of Pathology*, vol. 164, no. 2, pp. 441–447, 2004.
- [35] H. Kawasaki, K. Mizuseki, S. Nishikawa et al., "Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity," *Neuron*, vol. 28, no. 1, pp. 31–40, 2000.
- [36] J. H. Lim, C. S. Jung, B. Y. Byeon et al., "Establishment of a canine spinal cord injury model induced by epidural balloon compression," *Journal of Veterinary Science*, vol. 8, no. 1, pp. 89–94, 2007.
- [37] M. Sundin, O. Ringdén, B. Sundberg, S. Nava, C. Götherström, and K. Le Blanc, "No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients," *Haematologica*, vol. 92, no. 9, pp. 1208–1215, 2007.
- [38] K. Bieback, A. Hecker, A. Kocaömer et al., "Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow," *Stem Cells*, vol. 27, no. 9, pp. 2331–2341, 2009.
- [39] R. B. Delamarter, J. Sherman, and J. B. Carr, "Pathophysiology of spinal cord injury. Recovery after immediate and delayed decompression," *Journal of Bone and Joint Surgery A*, vol. 77, no. 7, pp. 1042–1049, 1995.
- [40] C. G. Xiao, "Reinnervation for Neurogenic Bladder: historic review and introduction of a somatic-autonomic reflex pathway procedure for patients with spinal cord injury or spina bifida," *European Urology*, vol. 49, no. 1, pp. 22–29, 2006.

7 DISCUSSÃO

O número limitado de estudos realizados em lesões medulares crônicas tratadas com terapia celular, aliado à maioria dos trabalhos disponíveis na literatura que utilizam como modelos roedores murinos, reforça a relevância dos nossos estudos. Há vários mecanismos capazes de provocar uma lesão medular, sendo os mais utilizados a técnica de queda de peso (BEHRMANN *et al.*, 1992; GRUNER, 1992), dispositivos eletromagnéticos (BEHRMANN *et al.*, 1992; STOKES *et al.*, 1992; HIRUMA *et al.*, 1999), ou um clipe de aneurisma modificado (VON EULER *et al.*, 1997). Estes modelos são eficientes no que diz respeito à homogeneidade da lesão, entretanto não representam de forma satisfatória o mecanismo preciso da lesão medular espontânea ou traumática, como é o caso dos animais tratados nesta pesquisa.

A ocorrência de trauma seguido de compressão medular em cães e em gatos possibilita o emprego destas espécies como modelos naturais para o emprego da terapia com CTMO. A escolha das espécies felina e canina para essa proposta terapêutica foi considerada também em razão de que a maioria dos trabalhos envolvendo lesões medulares, utilizando roedores, suprimem as diferenças neuroanatômicas e neurofisiológicas em relação ao ser humano. Acredita-se que estas diferenças podem atrapalhar na extrapolação de resultados comparativos (BARNABÉ-HEIDER e FRISEN, 2008). Neste trabalho procurou-se avaliar além do aspecto epidemiológico das lesões, a facilidade de aquisição e o comportamento das CTMO canina e felina e o resultado terapêutico do seu uso em casos clínicos.

Assim como a medula óssea é fonte de CT, o tecido adiposo também possui células mesenquimais com características semelhantes em termos de estabilidade de cultivo além de

estar francamente disponível e acessível. Outras vantagens do uso de CT advindas de tecido adiposo é o número de células obtidas por coleta e suas características *in vitro* de originar células das diferentes linhagens (ERICKSON *et al.*, 2002; SAFFORD *et al.*, 2002; ZUK *et al.*, 2002; GIMBLE e GUILAK, 2003a; PLANAT-BENARD *et al.*, 2004). Neste trabalho, para o cão e para o gato, também foram realizados o cultivo de CT de tecido adiposo e de medula óssea (dados não publicados) e compararam-se as culturas. A coleta nos felinos, por apresentarem menor volume de gordura subcutânea que nos caninos, foi realizada com maior dificuldade e em alguns casos houve necessidade de dissecação cirúrgica do tecido, tornando o procedimento mais invasivo naquela espécie. Por este motivo e por questões de padronização da fonte celular para futuros usos, foi selecionada, como fonte celular, as CT mesenquimais de medula óssea para ambas as espécies.

As CTMO caninas e felinas se mostraram aderentes ao poliéster e demonstraram rápida expansão e proliferação após seu isolamento *in vitro*. Observou-se que o comportamento celular em cultivo foi muito semelhante àquele observado em CTMO em humanos (ROMANOV *et al.*, 2005) e em outras espécies de animais de laboratório (SHANG *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2004). Para qualificação de um tipo celular em CT, é utilizado o critério de avaliação do potencial de diferenciação celular em um tipo celular adulto diferenciado (MEIRELLES e NARDI, 2003). Nas culturas de CTMO obtidas em ambas as espécies foram observadas propriedades de diferenciação osteogênica e adipogênica e altos índices de proliferação, que enfatiza o seu emprego com fins terapêuticos (TENG *et al.*, 2002; MYCKATYN *et al.*, 2004; PLUCHINO *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2006; KEIRSTEAD *et al.*, 2006). Um critério que deve ser observado, relacionado à seleção dos pacientes, é a idade. Nesta pesquisa, não foi possível a obtenção de culturas celulares viáveis de gatos com idade superior a 12 anos e nem de cães com idade superior a 13 anos ou, quando obtidas, as

células apresentavam morfologia estrelada precocemente. A aplicabilidade das células depende de sua capacidade de enxertia nos tecidos hospedeiros, que foi considerada elevada, uma vez que apresentaram alto percentual de sobrevivência e integração nas áreas de lesão, conforme demonstrado previamente (KANG *et al.*, 2006).

A conduta médico-veterinária tradicional foi o primeiro ponto de estrangulamento desta pesquisa. A busca por proprietários que se dispusessem a tratar um animal que a priori, ficaria permanentemente lesionado e paralítico, se tornou o primeiro dos desafios. Foi necessário também conseguir mudar o paradigma dentro das clínicas veterinárias, onde o destino dos pacientes com lesão de coluna seria unicamente a eutanásia. Cabe ressaltar que as imagens de tomografia computadorizada e de ressonância magnética nuclear obtidas e ilustradas nestes trabalhos não foram obtidas em clínicas/hospitais veterinários por não haver esta disponibilidade à época de sua realização.

A origem da descrença de uma possível melhora é que até pouco tempo o sistema nervoso central dos mamíferos era tido como incapaz de se reparar ou regenerar após algum grau de lesão (YAMAMOTO *et al.*, 2001). Por esta razão, a eutanásia dos animais é realizada devido a um prognóstico ruim em relação à recuperação. A melhora clínica, ainda que possa ser esperada em uma parcela da desta população não tratada cirurgicamente, apenas é relatada em período inferior a 30 dias de lesão (OLBY *et al.*, 2003; ARIAS *et al.*, 2007; ROSMARI *et al.*, 2011; THEDA *et al.*, 2011)

Após o trabalho com os proprietários e clínicos como primeiro passo, procurou-se entender qual seria a realidade das lesões raquimedulares em animais de companhia de Salvador e a partir de então desenvolver uma metodologia de terapia celular para o tratamento destas lesões em um modelo viável tecnicamente e cujos resultados pudessem ser

extrapolados a uma realidade local dentro da medicina veterinária e em um futuro próximo, para o ser humano.

Por outro lado, o foco deste grupo de pesquisa é a terapia celular aliada ao tratamento convencional em casos de doença natural. Especialmente por este motivo, as avaliações foram limitadas a aspectos clínicos e de imagem. Possivelmente, o acesso ao material pós-tratamento para estudos histológicos favoreceria um entendimento mais aprofundado dos achados. Porém, apesar de não ser objetivo o seguimento crônico dos animais, hoje, após quase sete anos de terapia celular no gato do manuscrito II e quase quatro anos após o protocolo ter sido instituído nos cães do manuscrito III, o felino continua vivo, bem como um dos quatro cães. Nenhum dos animais, em qualquer fase do seguimento, apresentou doença ou sequer sintoma de causas relacionadas à indução de neoplasia ou outras moléstias proliferativas ao sistema nervoso central, ratificando a segurança da metodologia empregada em longo prazo. A causa mortis dos animais que vieram a óbito não foi relacionada a alterações em coluna ou a aplicação das células-tronco.

Ao longo das últimas décadas, houve uma marcada evolução das técnicas cirúrgicas. O uso de implantes aperfeiçoados propicia a realização de cirurgias de reconstrução com fixação de fraturas instáveis. A prevenção de danos adicionais e a facilitação da reabilitação precoce são vantagens consagradas. Entretanto, isoladamente não conduzem à melhora do estado neurológico necessitando de terapias complementares. Associado a isto, demonstra-se que, para recuperação da qualidade de vida do paciente com lesão medular, a medula não necessariamente precisaria ser totalmente reconstruída. Benefícios desproporcionais podem ser obtidos de mínimas reparações anatômicas (CRISTANTE, 2005).

Alguns autores sugerem que o tratamento de lesões de coluna a partir do uso de células-tronco possa ser recomendado apenas para casos agudos, ou seja, com tempo por lesão

entre 7 e 21 dias (LIM *et al.*, 2007). Os resultados desta pesquisa demonstram que parte dos animais tratados apresentou o retorno do movimento voluntário da cauda, o que segundo Olby *et al.* (2003) é o primeiro sinal indicativo da recuperação da função motora. A melhora parcial dos indivíduos, prontamente no gato e mais tardiamente observada nos cães, pode se dever pelo menos parcialmente à estimulação e/ou reativação de alguns grupos musculares mais craniais (mm. quadríceps, sartorio, adutor, grácil, gastrocnêmio e bíceps femoral) cujas origens ocorrem caudais à lesão entre L4-L6 (nervo femoral e nervo obturador) e entre L6-S2 (nervo isquiático). Pelo menos uma melhor função dos neurônios motores inferiores foi alcançada, uma vez que antes da aplicação, a movimentação destes grupos musculares não era observada como foi demonstrado no vídeo complementar do manuscrito II (em anexo).

Desordens urológicas secundárias a lesão de coluna incluem disfunção supraespinhal, reinervação aferente e reorganização intra-espinhal (CRAGGS *et al.*, 2006; SAMSON and CARDENAS, 2007; HERRERA *et al.* 2010). Na maioria dos casos de lesão compressiva medular, no cão, o controle da vesícula urinária somente é alcançado quando a descompressão cirúrgica ocorre com brevidade (DELAMARTER *et al.*, 1995). Tentativas prévias de reestabelecer a função da bexiga urinária, incluindo transplante de nervos periféricos, não foram bem sucedidos em consequência de controle ineficiente sobre a reinervação (XIAO, 2006). Na presente pesquisa, os ganhos efetivos de controle funcional de vesícula urinária não foram associados com sinais de melhora na MRI apesar do longo prazo de acompanhamento. Dois anos após o transplante, à despeito dos benefícios para a vesícula urinária, do ponto de vista clínico, nenhuma complicação à curto ou à longo prazo foram observadas.

Percebeu-se, ao longo dos experimentos (dados não apresentados), e a partir da troca de experiência com outros autores, utilizando modelos distintos nas espécies canina

(NISHIDA *et al.*, 2011; SARMENTO, 2013), felina e humana (SYKOVÁ *et al.*, 2006), que a melhora clínica apresenta relação com o tempo. Por motivo ainda desconhecido, percebeu-se que o período de melhora não foi superior a cerca de três meses após aplicação única. Acreditando em possíveis vantagens terapêuticas para o uso seriado das células, um projeto piloto foi realizado com um cão que, após o emprego da terapia seguindo o protocolo de aplicação do manuscrito III, deu seguimento a uma série de aplicações a cada 45 dias, por via epidural, de 10^6 células mesenquimais de medula óssea autólogas durante 1 ano. Durante as primeiras aplicações não havia necessidade de sedação e não foi observado nenhum sinal clínico de melhora distinto daqueles descritos para os outros cães. A melhora clínica tornou-se mais evidente após 8 meses de tratamento e incluiu percepção de dor com vocalização durante a última aplicação, sendo este o motivo de descontinuidade do tratamento. O cão ganhou mobilidade em membros pélvicos, movimento e tônus de cauda, muito embora não tenha sido o suficiente para apoio funcional dos membros pélvicos. Após a suspensão da terapia, os parâmetros clínicos estagnaram e este cão veio a óbito após 2 anos da primeira aplicação por erliquiose (hemoparasito) e não foi autorizada a necropsia. Estes achados sugerem, em casos crônicos, que talvez seja benéfico o uso de terapia celular seriada.

Era pretensão da pesquisa desenvolver algum método de avaliação mais direcionada a interpretação dos achados neurofuncionais pós-terapia, porém a eletroneuromiografia e a avaliação dos potenciais evocados, mostraram-se insatisfatórios enquanto método para cães e para gatos (dados não publicados). Os indivíduos nesta pesquisa não se adequaram aos protocolos conhecidos à época e/ou talvez o avaliador não tenha sido eficiente ou suficientemente capacitado para tal fim. De uma maneira ou de outra, em humanos, com o uso de CT mesenquimal de sangue periférico, no primeiro estudo do gênero, no Brasil (CRISTANTE, 2005) o principal e único achado relevante foi a melhora do perfil

eletroneuromiográfico e isto apenas aconteceu após período superior a um ano da terapia. Em humanos (dados preliminares, em fase de publicação) não houve ganho em função elétrica após segmento de 6 meses. Acredita-se que com metodologia suplementar mais adequada, em cães, por período mais longo de avaliação, os resultados com eletroneuromiografia / potenciais evocados possa trazer dados complementares importantes no entendimento da terapia celular proposta.

Ainda na tentativa de desenvolver métodos confiáveis de avaliação neurológica, o emprego da tomografia computadorizada permitiu reconhecer as lesões decorrentes de trauma na quase totalidade dos animais, porém o tipo de lesão encontrada não viria a se tornar um modelo interessante, em especial por se tratar de traumas de magnitude, tempo de ocorrência e localização muito distintas umas das outras. O melhor modelo em termos de semelhança entre os casos clínicos, frequência, e de possibilidade de transposição dos achados por afinidade anatômica a humanos eram distúrbios compressivos crônicos em medula espinhal na espécie canina, sendo este o foco do terceiro manuscrito.

A ressonância nuclear magnética (MRI), apesar de mostrar-se bastante satisfatória, no início apresentou-se de difícil execução principalmente devido à falta de padronização própria para cães, à época de realização dos exames, e com o conhecimento pessoal disponível. O principal achado após a terapia que despertou interesse em entender o real papel da terapia celular, foi a não estagnação do processo de seringo/hidromielia em um dos cães. Após o advento da MRI, esta tem se tornado uma afecção cada vez mais diagnosticada. Por definição, a hidromielia é caracterizada como uma cavidade delineada por células endomiais, características do canal central da medula. Já a seringomielia é uma cavidade dentro da medula, porém exterior ao canal central que é circundada por células da glia. Alternativamente o líquido extravasado de uma seringomielia pode evoluir para um

preenchimento do canal central e se tornar um hidromielia (MILHORAT *et al.*, 1995). Muito embora os distúrbios sejam distintos, um quadro possa ser evolutivo do outro e a MRI não possa distinguir uma da outra, a MRI serve como exame excludente para outras causas como neoplasias, displasia de occipital, hidrocefalia e outros distúrbios da fossa posterior e do forame magnum. Com outras etiologias distintas, no cão uma das causas de seringomielia é a compressão medular crônica secundária à doença do disco intervertebral (DDIV) (BAGLEY, 2007). Em um dos cães tratados, a seringomielia evoluiu em termos de dimensões. Ao avaliar as imagens de MRI nenhuma outra possível causa foi diagnosticada e à despeito do implante das células, a doença não estacionou e mesmo assim o cão apresentou alguma discreta melhora, conforme explicitado no manuscrito III.

A ocorrência de novos focos herniados em cães da raça daschund terrier é frequentemente observada após o tratamento clínico e/ou cirúrgico de outros pontos herniados. Em um dos cães, uma protusão discal cervical, discretamente compressiva, foi responsável por dor no período pós-aplicação. No início do processo este parâmetro foi confundido com dor neuropática e assim que descartada esta possibilidade, o animal foi submetido a um tratamento medicamentoso e hoje está sem sinais clínicos de compressão cervical. Nos felinos cronicamente acometidos, luxação de patela e coxofemoral uni ou bilateral foi um achado frequente. Por necessitar de tratamento cirúrgico suplementar, alguns felinos não tinham condições de serem submetidos à terapia celular propriamente dita. As complicações decorrentes de distúrbios ortopédicos atrapalha enormemente a avaliação dos fisioterapeutas responsáveis pelo acompanhamento da evolução dos animais. Em especial, em um gato, a displasia coxofemoral aliada à ruptura dos ligamentos cruzados e contratura de quadríceps femoral unilaterais, conduziram à recomendação de amputação do membro antes de ter sido efetuada a terapia celular. No começo da pesquisa não havia ainda a clareza de

quanto que estas comorbidades viriam a influenciar o uso da terapia celular. Os animais com comorbidades ortopédicas foram excluídos do processo avaliativo.

Devido aos pequenos resultados práticos do uso de medicamentos e ainda do longo caminho a ser percorrido com estes novos estudos sobre a regeneração neuronal, não há presunção da terapia única.

Por fim, nossos resultados estimularam a realização de um estudo clínico em pacientes portadores de lesões raquimedulares crônicas, trabalho esse recentemente submetido para publicação.

8 CONCLUSÕES

- A aquisição de células tronco derivadas de medula óssea no cão e no gato domésticos se mostrou viável e segura;
- As CTMO das espécies felina e canina apresentam potencial plástico semelhante entre si, tendo sido demonstrada a sua capacidade de se diferenciar de forma induzida em células adiposas e ósseas;
- O uso de dose única de CTMO autólogas, *in loco* lesional, em casos crônicos de compressão/ isquemia raquimedular em cães e em gato domésticos não foi o suficiente para recuperação funcional total das lesões, muito embora tenham contribuído para uma melhora da qualidade de vida dos pacientes;
- Embora se observe uma melhora clínica considerável nos pacientes, os achados de imagem da ressonância nuclear magnética, apontam para uma estagnação e em alguns casos, por causas não relacionadas à terapia, uma progressão da lesão.
- Considerando a falta de perspectiva de retorno funcional em lesão medular crônica, a terapia celular surge como uma alternativa viável a ser explorada e desenvolvida para a obtenção de resultados mais promissores que os aqui descritos.

REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, Y.; RADTKE, C.; KOCSIS, J.D. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. **J Neurosci.**, v.22, p.6623-6630, 2002.
- ARINZEH, T.L.; PETER, S.J.; ARCHAMBAULT, M.P.; VAN DEN BOS, C.; GORDON, S.; KRAUS, K.; SMITH, A.; KADIYALA, S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. **J Bone Joint Surg Am.**, v.85, p.1927-35, 2003.
- BAGLEY, R.S. Syringomyelia: An emerging spinal disease in dogs. **Irish Vet. J.**, v.60, p.35-38, 2007.
- BAHR ARIAS, M. V.; SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. **Semina.**, v.28, p.115-134, 2007.
- BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **J. Cell. Mol. Med.**, v.8, p. 301-316, 2004.
- BARNABÉ-HEIDER, F.; FRISÉN, J. Stem cells for spinal cord repair. **Cell Stem Cell.**, v.3, p.16-24, 2008.
- BARNETT, G. H.; HARDY JR., R. W.; LITTLE, J. R.; BAY, J. W.; SYPERT, G.W. Thoracic spinal canal stenosis. **J. of Neurosurg.**, v. 66, p.338-344, 1987.
- BEATTIE, M.S.; FAROOQUI, A.A.; BRESNAHAN, J.C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. **J. Neurotrauma.**, v.17, p. 915-25, 2000.
- BEHRMANN, D. L.; BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M. S.; SHAN, B.R. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. **J. Neurotrauma.**, v.9, p.197–217, 1992.
- BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Stem cells in tissue engineering. **Nature**, v.414, p.118-121, 2001.
- BLESCH, A.; LU, P.; TUSZYNSKI, M.H. Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair. **Brain Res Bull.**, v.57, p.833–838, 2002.
- BLIGHT, A.R.; TOOMBS, J.P.; BAUER, M.S.; WIDMER, W.R. The Effects of 4-Aminopyridine on Neurological Deficits in Chronic Cases of Traumatic Spinal Cord Injury in Dogs: A Phase I Clinical Trial. **J. Neurotrauma.**, v.8, p.103-119, 1991. doi:10.1089/neu.1991.8.103.

- BRAUND, K. G. Traumatismo agudo da medula espinal. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais**. Manole, 1996. p. 1311-1325.
- BRAUND, K.G. Traumatic disorders. In: VITE, C.H. (Ed.) *Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment*. **International Veterinary Information Service**. Ithaca NY (www.ivis.org) 2003; A3229.0203.
- BRAY J.P.; BURBIDGE H.M.; The canine intervertebral disk: part one:structure and function. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.34, p.55-63, 1998.
- BREGMAN, B.S.; GOLDBERGER, M. E. Infant lesion effect: II. Sparing and recovery of function after spinal cord damage in newborn and adult cats. **Brain Res.**, v.285, n.119-135, 1983.
- BRUSTEIN, E.; ROSSIGNOL, S. Recovery of Locomotion After Ventral and Ventrolateral Spinal Lesions in the Cat. I. Deficits and Adaptive Mechanisms. **J. Neurophysiol.**, v.80, p.1245-1267, 1998.
- CHRISMAN, C. L. Paraplegia, Paraparesia e Ataxia dos Membros Posteriores. In: **Neurologia dos Pequenos Animais**. Roca, 1985, p. 339-368.
- CHUAN-GUO, X. Reinnervation for Neurogenic Bladder: Historic Review and Introduction of a Somatic-Autonomic Reflex Pathway Procedure for Patients with Spinal Cord Injury or Spina Bifida. **Euro. Urol.**, v.49, p.22-29, 2006.
- COSTA, R. C. Disco Intervertebral: Base para o Diagnóstico e Tratamento da Doença. **R. Nosso Clínico**; São Paulo, v. 20, p. 18-26, 2001.
- CRAGGS, M.D.; BALASUBRAMANIAM, A.V.; CHUNG, E.A.; EMMANUEL, A.V. Aberrant reflexes and function of the pelvic organs following spinal cord injury in man. **Auton. Neurosci.**, v.126-127, p.355-370, 2006.
- CRISTANTE, A. F.; Emprego das células progenitoras no tratamento da lesão medular crônica em humanos: análise do potencial evocado somato-sensitivo em 39 pacientes (tese doutorado) **Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**. 131p, 2005.
- DEFINO, H.L.A. Trauma Raquimedular. **Medicina.**, v.32, p.388-400, 1999.
- DELAMARTER, R.B.; SHERMAN, J.; CARR, J.B. Pathophysiology of spinal cord injury. Recovery after immediate and delayed decompression. **J. Bone Joint Surg.**, v.77, p.1042-9, 1995.
- DENG, Y.B.; LIU, X.G.; LIU, Z.G.; LIU, X.L.; LIU, Y.; ZHOU, G.Q. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys. **Cytherapy.**, v.8, p.210-214, 2006.

- DeRISIO, L.; ADAMS, V.; DENNIS, R.; MCCONNELL, F.J. Association of clinical and magnetic resonance imaging findings with outcome in dogs with presumptive acute noncompressive nucleus pulposus extrusion: 42 cases (2000–2007). **JAVMA.**, v.234, p.495-504, 2009.
- DeVIVO, M.J.; Epidemiology of traumatic spinal cord injury. In: KIRSHBLUM, S.; CAMPAGNOLO, D.I.; DeLISA, J.A. (eds.) **Spinal Cord Medicine**. Lippincott Williams e Wilkins. p.69-81, 2002.
- DONOVAN, P.J.; GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, v.414, p.92-97, 2001.
- ENZMANN, G.U.; BENTON, R.L.; TALBOTT, J.F.; CAO, Q.; WHITTEMORE, S.R. Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. **J Neurotrauma.**, v.23, p.479–495, 2006.
- EURELL, J.A.; FRAPPIER, B.L. (eds). **Dellmann's textbook of veterinary histology**. 6. ed. Blackwell Publishing: Iowa. 2006.
- FALAVIGNA, A.; RIGHESSE NETO, O.; FERRAZ, F. A. P.; BONIATTI, M. M. Fratura traumática de coluna torácica t1-t10. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria.**, v.62, p. 1095-1099, 2004.
- FERNÁNDEZ, V. L.; BERNARDINI, M. Neurologia em cães e gatos. São Paulo: **MedVet.**, 447 p., 2010.
- FINE, A. Transplantation of fetal cells and tissue: an overview. **CMAJ**. v.151, p.1261-1268, 1994.
- FOSSUM, T. W. Neurocirurgia. In: _____. **Cirurgia de Pequenos Animais**. Roca. 2002, p. 1185-1309.
- GALIS, J.C.; MEIRELLES JR, J.S. Compressão pós-trumática do nervo fibular superficial. **Rev Bras Ortop.**, v.34, p. 401-404, 1999.
- GLIMM, H.; EAVES, C. J. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. **Blood.**, v.94, p.2161-2168, 1999.
- GO, B.K.; DeVIVO, M.J; RICHARDS, J.S. The epidemiology of spinal cord injury. In: STOVER, S.L.; DeLISA, J.A.; WHITENECK, G.G. eds. Spinal Cord Injury. **Aspen**. p.21-55, 1995.
- GOOLSBY, J.; MARTY, M.C.; HELETZ, D.; CHIAPPELLI, J.; TASHKO, G.; YARNELL, D.; FISHMAN, P.S.; DHIB-JALBUT, S.; BEVER JR., C.T.; PESSAC, B.; TRISLER, D. Hematopoietic progenitors express neural genes. **PNAS.**, v.100, p.14926-14931, 2003.

- GRUNER, J. A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. **J. Neurotrauma.**, v.9, p.123–126, 1992.
- HASSINK, R.J.; BRUTEL de la RIVIERE, A.; MUMMERY, C.L.; DOEVENDANS, P.A. Transplantation of cells for cardiac repair – Review. **J Am Coll Cardiol.**, v.5, p.711-7, 2003.
- HAWRYLUK, G.W.J.; FEHLINGS, M.G. The center of the spinal cord may be central to its repair. **Cell Stem Cell.**, v.3, p.230-232, 2008.
- HERRERA, J.J.; HAYWOOD-WATSON II, R.J.L.; GRILL, R.J. Acute and Chronic Deficits in the Urinary Bladder after Spinal Contusion Injury in the Adult Rat. **J. Neurotrauma.**, v.27, p.423–431, 2010.
- HIRUMA, S.; OTSUKA, K.; SATOU, T.; HASHIMOTO, S. Simple and reproducible model of rat spinal cord injury induced by a controlled cortical impact device. **Neurol. Res.**, v.21, n.313–323, 1999.
- HOFFMAN, J.M.; BOMBARDIER, C.H.; GRAVES, D.E.; KALPAKJIAN C.Z.; KRAUSE, J.S.; A longitudinal study of depression from 1 to 5 years after spinal cord injury. **Arch Phys Med Rehabil.**, v.92, p.411-8, 2011.
- HOFSTETTER, C.P.; SCHWARZ, E.J.; HESS, D. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.99, p.2199-2204, 2002.
- HULSEBOSCH, C.E. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. **Adv. Physiol. Educ.**, v.26, p. 238–255, 2002.
- HUNG, S.C.; CHENG, H.; PAN, C.Y.; TSAI, M.J. KAO, L.S.; MA, H.L. *In vitro* differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. **Stem Cells.**, v.20, p.522-529, 2002.
- HUTCHINSON, K.J.; GOMEZ-PINILLA, F.; CROWE, M.J.; YING, Z.; BASSO, D.M. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. **Brain.**, v.127, p.1403–1414, 2004.
- JACOBSON, R.E., GARGANO, F.P., ROSOMOFF, H.L. Transverse axial tomography of the spine. Part 2: the stenotic spinal canal. **J. Neurosurg.y.**, v.42, p. 412-419, 1975.
- JI-HEY, L.; CHANG-SU, J.; YE-EUN, B.; WAN HEE, K.; JUNG-HEE, Y.; KYUNG-SUN, K.; OH-KYEONG, K. Establishment of a canine spinal cord injury model induced by epidural balloon compression. **J. Vet. Sci.**, v.8, p.89–94, 2007a.
- JI-HEY, L.; YE-EUN, B.; HAK-HYUN, R.; YUN-HYEOK, J.; YOUNG-WON, L.; WAN HEE, K.; KYUNG-SUN, K.; OH-KYEONG, K. Transplantation of canine

umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. **J. Vet. Sci.**, v.8, p.275–282, 2007b.

JOHANSSON, C. B.; MOMMA, S.; CLARKE, D. L.; RISLING, M.; LENDAHL, U.; FRISEN, J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. **Cell.**, v.96, p.25-34, 1999.

KADIYALA, S.; YOUNG, S.R.; THIEDE, M.A.; BRUDER, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and *in vitro*. **Cell Transplant.**, v.6, p.125–134, 1997.

KANG, S.K.; SHIN, M.J.; JUNG, J.S.; KIM, Y.J.; KIM, C.H. Autologous Adipose Tissue-derived Stromal Cells for Treatment of Spinal Cord Injury. **Stem cells and development.**, v.15, p.583–594, 2006.

KAWASAKI, H.; MIZUSEKI, K.; NISHIKAWA, S.; KANEKO, S.; KUWANA, Y.; NAKANISHI, S.; NISHIKAWA, I.; SASAI, Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. **Neuron.**, v.8, p.31–40, 2000.

KEIRSTEAD, H.S.; NISTOR, G.; BERNAL, G.; TOTOIU, M.; CLOUTIER, F.; SHARP, K.; STEWARD, O. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury. **J. Neurosci.**, v.25, p.4694–4705, 2006.

KOPEN, G.C.; PROCKOP, D.J.; PHINNEY, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.96, p.10711–10716, 1999.

KRAUSE, J.S.; STERNBERG, M.; LOTTES, S. Mortality after spinal cord injury: an 11-year prospective study. **Arch Phys Med Rehabil.**, v.78, p.815-21, 1997.

LANKHORST, A.J.; ter LAAK, M.P.; van LAAR, T.J.; van MEETEREN, N.L.; de GROOT, J.C.; SCHRAMA, L.H. *et al.* Effects of enriched housing on functional recovery after spinal cord contusive injury in the adult rat. **J. Neurotrauma.**, v.18, p. 203–215, 2001.

LAURER, HELMUT; MAIER, B; SAMAN, A. L.; LEHNERT, M.; WYEN, H.; MARZIL, I. Distribution of Spinal and Associated Injuries in Multiple Trauma Patients. **Euro J. Trauma Emerg. Surg.** v.33, p.476-481, 2007.

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

LINKE, A.; PATRICK MULLER, P.; NURZYNSKA, D.; CASARSA, C.; TORELLA, D.; NASCIMBENE, A.; CASTALDO, C.; CASCAPERA, S.; BÖHM, M.; QUAINI, F.; URBANEK, K.; LERI, A.; HINTZE, T.H.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. Stem cells in

the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. **PNAS.**, v.21, p.8966–8971, 2005.

LOVELL-BADGE, R. The future for stem cell research. **Nature**, v.414, p. 88-91, 2001.

MACHADO, A. B. M. Estrutura da Medula Espinhal. *In: Neuroanatomia Funcional*. (2ed). Atheneu. 2000, p. 151-162.

MACIAS, M.Y.; SYRING, M.B.; PIZZI, M.A. Pain with no gain: Allodynia following neural stem cell transplantation in spinal cord injury. **Exp. Neurol.**, v.201, p.335-348, 2006.

MAUTES, A.E.M.; LIU, J.; BRANDEWIEDE J.; MANVILLE, J.; SNYDER, E.; SCHACHNER, M. Regional energy metabolism following short-term neural stem cell transplantation into the injured spinal cord. **J Mol Neurosci.**, v.24, p.227-236, 2004.

McKAY, R. Stem cells in the central nervous system. **Science.**, v.276, p.6–71, 1997.

MEIRELLES, L.S.; NARDI N.B. Murine marrow derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. **Br J Haematol.**, v.123, p.702–711, 2003.

MELETIS, K.; BARNABÉ-HEIDER, F.; CARLÉN, M.; EVERGREN, E.; TOMILIN, N.; SHUPLIAKOV, O. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. **PLoS Biology.**, v.6, p.1494-1507, 2008.

MEZEY, E.; KEY, S.; VOGELSANG, G.; SZALAYOVA, I.; LANGE. G.D.; CRAIN, B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.100, p.1364-1369, 2003.

MUSCHLER, G.F.; MATSUKURA, Y.; NITTO, H.; BOEHM, C.A.; VALDEVIT, A.D.; KAMBIC, H.E.; DAVROS, W.J.; EASLEY, K.A.; POWELL, K.A. Selective retention of bone marrow-derived cells to enhance spinal fusion. **Clin Orthop Relat Res.**, v.432, p.242-51, 2005.

MYCKATYN, T.M.; MACKINNONA, S.E.; McDONALD, J.W. Stem cell transplantation and other novel techniques for promoting recovery from spinal cord injury. **Transplant Immunology.**, v.12, p.343-358, 2004.

NIKU, M.; ILMONEN, L.; PESSA-MORIKAWA, T.; IVANAINEN, A. Limited contribution of circulating cells to the development and maintenance of nonhematopoietic bovine tissues. **Stem Cells.**, v.22, p.12–20, 2004.

NORENBERG, M.D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **J. Neurotrauma.**, v.21, p.429–440, 2004.

OKADA, S.; ISHII, K.; YAMANE, J.; IWANAMI, A.; IKEGAMI, T.; KATOH, H. *et al.* In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the

optimal timing of transplantation for spinal cord injury. **FASEB J.**, v.19, p.1839-1841, 2005.

OLBY N. Current concepts in the management of acute spinal cord injury. **J Vet Intern Med.**, v.13, p.399-407, 1999.

OLBY, N. J.; De RISIO, L.; MUNANA, K. R.; WOSAR, M. A.; SKEEN, T. M.; SHARP, N. J.; KEENE, B. W. Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. **American Journal of Veterinary Research.**, v. 62, p.1624-1628, 2001.

OLBY, N.J.; HARRIS, T.; BURR, J.; MUÑANA, K.R.; SHARP, N.J.H.; KEENE, B. Recovery of pelvic limb function in dogs following acute intervertebral disc herniations. **J Neurotrauma.**, v.21, p.49-59, 2004.

OMOJOLA, M. F. Trauma to the spinal cord. *In* NALDICH, T. P. Imaging of the spine. **Elsevier.** p. 237-246, 2011.

PARK, D. H.; EVE, D. J.; CHUNG, Y. G.; SANBERG, P. R. Regenerative medicine for neurological disorders. **Sc W. Journal.**, v.16, p.470-89, 2010.

PEDERSEN, N.C. A review of immunological diseases of the dog. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.69, p.251-342, 1999.

PENHA, E. M.; AGUIAR, P. H. P.; BARROUIN-MELO, S. M.; LIMA, R.C; SILVEIRA, A. C. C.; OTELO, A. R. S.; PINHEIRO, C. M. B.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P. Cellular therapy and hemilaminectomy in clinical neurofunctional rehabilitation of a cat with raquimedular lesion: a case report. *In*: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE TERAPIAS AVANÇADAS e CÉLULAS-TRONCO, 2007, Rio de Janeiro. **Anais.** Rio de Janeiro: 2007.

PETERSEN, B.E.; BOWEN, W.C.; PATRENE, K.D.; MARS, W.M.; SULLIVAN, A.K.; MURASE, N.; BOGGS, S.S.; GREENBERGER, J.S.; GOFF, J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science.**, v.284, p.1168–1170, 1999.

PLUCHINO, S.; ZANOTTI, L.; DELEIDI, M.; MARTINO, G. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. **Brain Res Rev.**, v.48, p.211-219, 2005.

RINGE, J.; KAPS, C.; SCHMITT, B.; BUSCHER, K.; BARTEL, J.; SMOLIAN, H.; SCHULTZ, O.; BURMESTER, G.R.; HAUPL, T.; SITTINGER, M. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. **Cell Tissue Res.**, v.307, p.321–327, 2002.

ROMANOV, Y.A.; DAREVSKAYA, A.N.; MERZLIKINA N.V.; AND BURAVKOVA, L.B. Mesenchymal Stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation,

characterization, and differentiation potentialities. **Cell Techn Biol Med.**, v.3, n.138-143, 2005.

ROSSIGNOL, S; SCHWAB, M; SCHWARTZ, M; FEHLINGS, M. G. Spinal Cord Injury: Time to Move?. **J Neuro.**, v.44, n.11782–11792, 2007.

SAMSON, G.; CARDENAS, D.D. Neurogenic bladder in spinal cord injury. **Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.** v.18, p.255– 274, 2007.

SARMENTO, C.A.P. **Utilização de células tronco da medula óssea de fetos caninos em cães adultos com lesão medular crônica toracolombar.** 83p. il. Tese (doutorado em ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2013.

SCHULTZ E, LIPTON BH: Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. **Mech Ageing Dev.**, v.20, p.377—383, 1982.

SCOTT, H.W.; McKEE, W.M. Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. **JSAP.**, v.40, p.417–422, 1999.

SEKHON, L.H.S.; FEHLINGS, M.G. Epidemiology, Demographics, and Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. **Spine.**, v.26, p.S2-S12, 2001.

SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A.; ARIAS, M. V. B. Fisiopatologia do trauma e da compressão à medula espinhal de cães e gatos. **Med Vet.**, v.1, p.78-85, 2007.

SHANG, Q.; WANG, Z.; LIU, W.; SHI, Y.; CUI, L.; CAO, Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. **J Craniofac Surg.**, v.12, p.586–593, 2001.

SHARP, N.J.H.; WHEELER, S.J. **Small animal spinal disorders: Diagnosis and surgery.** 2 ed. Elsevier Mosby. 2005, 379p. ISBN: 072332090.

SHORES, A. Fractures and luxations of the vertebral column. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.22, p.171-180, 1992.

SILVA, G.V.; LITOVSKY, S.; ASSAD, J.A.R.; SOUSA, A.L.S.; MARTIN, B.J.; VELA, D.; COULTER, S.C.; LIN, J.; OBER, J.; VAUGHN, W.K.; BRANCO, R.V.C.; OLIVEIRA, E.M.; HE, R.; GENG, Y.J.; WILLERSON, J.T.; PERIN, EC. Mesenchymal Stem Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Canine Chronic Ischemia Model. **Circulation.**, v.18, p.150-156, 2005.

SMITH, G.K.; WALTER, M.C. Fractures and luxations of the spine. In: NEWTON, C.D.; NUNAMAKER, D.M. (eds). **Textbook of small animal orthopaedics.** Ithaca: International Veterinary Information Service. cap.19, 1985.

SOARES, M.B.; LIMA, R.S.; ROCHA, L.L; TAKYIA, C.M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; CARVALHO, A.C.C; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **Am J Pathol.**, v.164, p.441-447, 2004.

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

STREM, B.M.; HICOK, K.C.; ZHU, M., WULUR, I.; ALFONSO, Z.; SCHREIBER, R.E.; FRASER, J.K. AND HEDRICK, M.H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med.**, v.54, p.132-141, 2005.

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

TAKAHASHI, M.; NAKAMURA, T.; TOBA, T.; KAJIWARA, N.; KATO, H.; SHIMIZU, Y. Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs. **Tissue Eng.**, v.10, p.771-9, 2004.

TENG, Y.D.; LAVIK, E.B.; QU, X.; PARK, K.I.; OUREDNIK, J.; ZURAKOWSKI, D.; LANGER, R.; SNYDER, E.Y. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. **PNAS.**, v.99, p.3024–3029, 2002.

TERADA, N.; HAMAZAKI, T.; OKA, M.; HOKI, M.; MASTALERZ, D.M.; NAKANO, Y.; MEYER, E.M.; MOREL, L.; PETERSEN, B.E.; SCOTT, E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature.**, v.416, p.542-545, 2002. doi:10.1038/nature730

THACHER, C. Biomecânica das Fraturas Cranianas, Espinhais e Luxações. In BOJRAB M. J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais**. Manole, 1996, p. 1150-1160.

THURET, S.; MOON, L.D.; GAGE, F.H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nat. Rev. Neurosci.** v.7, p.628–643, 2006.

UEMURA, R.; XU, M.; AHMAD, N.; ASHRAF, M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. **Circulation Res.**, v.98, p.1441-1421, 2006.

UMPHRED, D.A.; SCHNEIDER, F.J. **Fisioterapia Neurológica**. 2ed. São Paulo: Manole, 1994.

van MEETEREN, N.L.; EGGERS, R.; LANKHORST, A.J.; GISPEN, W.H.; HAMERS, F.P. Locomotor recovery after spinal cord contusion injury in rats is improved by spontaneous exercise. **J. Neurotrauma.**, v.20, p.1029–1037, 2003.

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

WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M.; WIRKNER, U.; KRAUSE, U.; BLAKE, J.; SCHWAGER, C.; ECKSTEIN, V.; ANSORGE, W.; HO, A.D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Exp Hematol.** v.33, p.1402-16, 2005.

WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S.; YOUNG, R.G.; MANSOUR, J.M.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M. Mesenchymal cellbased repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. **J Bone Joint Surg.**, v.76, p.579–592, 1994.

WHEELER, S.J. The paralyzed cat. **NAVC Conference Proceedings.**, p.584-586, 2005.

WITSBERGER, T.H.; LEVINE, J.M.; FOSGATE, G.T.; SLATER, M.R.; KERWIN, S.C.; RUSSEL, K.E.; LEVINE, G.J. Associations between cerebrospinal fluid biomarkers and long-term neurologic outcome in dogs with acute intervertebral disk herniation. **AVMA.**, v.240, p.555-562, 2012.

WOODBURY, D.; REYNOLDS, K.; BLACK, I.B. Adult bone marrow stromal stem cell express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. **J. Neurosc. Res.**, v.96, p.908–917, 2002.

WOODBURY, D.; SCHWARZ, E.J.; PROCKOP, D.J.; BLACK, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J. Neurosci. Res.**, v.61, p.364-370, 2000.

WORSTER, A.A.; NIXON, A.J.; BROWER-TOLAND, B.D.; WILLIAMS, J. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. **Am J Vet Res.**, v.61, p.1003–1010, 2000.

YAMAMOTO, N; YAMAMOTO, S; INAGAKI, F; KAWAICHI, M; FUKAMIZU A.; KISHI N, *et al.* Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. **J Biol Chem.**, v.276, p.45031-40, 2001.

YU Y.L.; DU BOULAY G.H.; STEVENS J.M., KENDALL B.E. Computed tomography in cervical spondylotic myelopathy and radiculopathy: visualisation of structures, myelographic comparison, cord measurements and clinical utility. **Neuroradiology**, v.28, p.221-236, 1986.

ZHAO, Z.M.; LI, H.J.; LIU, H.Y.; LU, S.H.; YANG, R.C.; ZHANG, Q.J.; HAN, Z.C. Intraspinal transplantation of CD34+ human umbilical cord blood cells after spinal cord

hemisection injury improves functional recovery in adult rats. **Cell Transplant.**, v.13, p.113-122, 2004.

ZUK , P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG J.L.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BEENHAIN, P. AND HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol of the Cell.**, v.13, p.4279-4295, 2002.

ZURITA, M.; VAQUERO, J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. **Neurosci. Lett.**, v.402, p.51-56, 2006.

ANEXO I

Capítulo do livro: PENHA, E.M.; SOARES, M.B.P; GUIMARÃES, E.T. Terapia com células-tronco. IN: RABELO, R. (Ed). **Emergências de pequenos animais: condutas clínicas e cirúrgicas no paciente grave**. ELSEVIER. Cap 56, p.676-690, 2013.

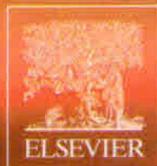
Vet | CONSULT

WWW.ELSEVIER.COM.BR/VETCONSULT

RODRIGO RABELO

EMERGÊNCIAS DE PEQUENOS ANIMAIS

CONDUTAS CLÍNICAS E CIRÚRGICAS
NO PACIENTE GRAVE



© 2013, Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados e protegidos pela Lei 9.610, de 19/02/1998.

Nenhuma parte deste livro, sem autorização prévia por escrito da editora, poderá ser reproduzida ou transmitida sejam quais forem os meios empregados: eletrônicos, mecânicos, fotográficos, gravação ou quaisquer outros.

ISBN: 978-85-352-5928-5

Capa

Folio Design

Editoração Eletrônica

Arte & Ideia

Elsevier Editora Ltda.

Conhecimento sem Fronteiras

Rua Sete de Setembro, nº 111 – 16º andar
20050-006 – Centro – Rio de Janeiro – RJ

Rua Quintana, nº 753 – 8º andar
04569-011 – Brooklin – São Paulo – SP

Serviço de Atendimento ao Cliente
0800 026 53 40
sac@elsevier.com.br

Preencha a ficha de cadastro no final deste livro e receba gratuitamente informações sobre os lançamentos e promoções da Elsevier.

Consulte também nosso catálogo completo, os últimos lançamentos e os serviços exclusivos no site www.elsevier.com.br

NOTA

O conhecimento médico está em permanente mudança. Os cuidados normais de segurança devem ser seguidos, mas, como as novas pesquisas e a experiência clínica ampliam nosso conhecimento, alterações no tratamento e terapia à base de fármacos podem ser necessárias ou apropriadas. Os leitores são aconselhados a checar informações mais atuais dos produtos, fornecidas pelos fabricantes de cada fármaco a ser administrado, para verificar a dose recomendada, o método e a duração da administração e as contraindicações. É responsabilidade do médico, com base na experiência e contando com o conhecimento do paciente, determinar as dosagens e o melhor tratamento para cada um individualmente. Nem o editor nem o autor assumem qualquer responsabilidade por eventual dano ou perda a pessoas ou a propriedade originada por esta publicação.

O Editor

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO-NA-FONTE
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ

R111e

Rabelo, Rodrigo Cardoso

Emergências de pequenos animais: condutas clínicas e cirúrgicas no paciente grave / Rodrigo Cardoso Rabelo. - 1. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2012.
1.200p. : il. ; 21 cm

ISBN 978-85-352-4754-1

1. Medicina veterinária de pequenos animais 2. Animais domésticos
3. Cirurgia veterinária. I. Título.

12-7093.

CDD: 636.0896075

CDU: 636.09

28.09.12 01.10.12

039159



CAPÍTULO

56

Terapia com Células-tronco

*Euler Moraes Penha**Milena Botelho Pereira Soares**Elisalva Teixeira Guimarães*

1. Introdução

A vida começa com uma cadeia de eventos primordiais envolvendo processos biológicos sofisticados e finamente regulados: proliferação, migração, diferenciação e especialização celular. É essa cascata de eventos que promove a perpetuação da maioria das linhagens tissulares em animais adultos. O fundamento básico desse processo começa com um componente essencial: a célula-tronco.

Associada à sua ampla capacidade de autorregeneração e de originar tipos celulares distintos do seu (característica chamada de diferenciação), as células-tronco são capazes de induzir outras células a se proliferarem e a se diferenciarem através da secreção de mediadores químicos e biológicos (citocinas e fatores de crescimento), além de se fusionarem em outros tipos celulares, favorecendo a restauração de suas funções.

Células-tronco adultas são encontradas em diversos tipos de tecidos e durante muito tempo acreditava-se que ocorria apenas a “maturação” da célula-tronco residente apenas no tipo específico de tecido em que habitava. As primeiras células-tronco residentes foram descobertas nos intestinos e na medula óssea. Alguns achados inesperados sobre a presença de células progenitoras não tumorais em indivíduos adultos, capazes de dar origem a tipos celulares

distintos do tecido que lhes deu origem, chamaram a atenção da comunidade científica. Uma nova realidade mudaria de uma vez por todas um antigo paradigma determinista de que todas as células progenitoras seriam pré-programadas a uma única e exclusiva linhagem. Células-tronco oriundas da medula óssea não necessariamente originam apenas linhagens hematopoiéticas, assim como células coletadas do sistema nervoso central nem sempre produzem linhagens neurogênicas. A grande diferença que existe na direção que essas células vão seguir está no microambiente em que elas se encontram e na capacidade e necessidade de mobilização celular no indivíduo.

O *homing* é a migração celular direcionada com objetivos definidos e determinados pelo microambiente e por mediadores químicos. Um amplo campo de pesquisas realizadas hoje é a busca pelo conhecimento dos mediadores que regulam o destino das células-tronco e como eles podem ser utilizados para fins terapêuticos.

Quando o tema terapia celular é posto em evidência, não apenas o tipo de célula a ser administrado deve ser considerado, como também as citocinas, fatores de crescimento e de adesão celulares, o arcabouço onde essas células serão implantadas e a forma de monitoramento dos seus efeitos. E, quando a proposta é um tratamento intensivo, há também de ser considerado o tempo disponível para determinada terapia e quais são as opções disponíveis e as já preconizadas para determinados fins. É com o intuito de esclarecer alguns desses aspectos que este capítulo foi redigido.

2. Conceitos de Terapia Celular

Por definição, células-tronco (CT) são células indiferenciadas, com habilidade de se autorrenovar, proliferar, de gerar tipos celulares especializados. O termo plasticidade refere-se ao potencial das CT de cruzar barreiras de linhagens e adotar um perfil de expressão de um fenótipo celular exclusivo. A singular habilidade de autoperpetuação das células-tronco é atribuída a uma divisão assimétrica: quando a CT se divide, dá origem a uma cópia exata de si mesma e a um novo tipo celular que irá diferenciar-se em uma célula madura do tecido. Isso ocorre na dependência de mecanismos de sinalização celular e de acordo com o microambiente em que as CT se encontram.

Segundo o seu grau de plasticidade, as linhagens celulares podem ser classificadas em totipotentes, quando têm capacidade de originar células derivadas de todos os folhetos embrionários, ou pluripotentes, quando dão origem a quase todos os tipos celulares maduros, com exceção apenas de tecidos extraembrionários como a placenta. As CT multipotentes são encontradas em tecidos adultos e, com certa limitação, podem diferenciar-se para produzir outros tipos celulares especializados. O termo progenitor se refere à célula com potencial mais restrito do que o as CT. Precursor é um termo aplicado a células com potencial de diferenciação mais limitado, que se refere a qualquer célula

lidam com terapia celular na clínica utilizam CT adultas, que a cada dia têm apresentado novos potenciais de diferenciação e de indução de reparo tecidual.

Dentre as fontes de CT adultas mais empregadas podemos citar a medula óssea, o tecido adiposo, a polpa de dente decíduo, o tecido nervoso periférico (especialmente bulbo olfatório), o tecido nervoso central e o tecido muscular. Essas fontes podem dar origem a células indiferenciadas ou diferenciadas, e culturas puras apenas com as CT ou ainda uma fonte contendo células mononucleares.

A fonte de CT adulta mais empregada e que é por mais tempo reconhecida é a medula óssea. Nesse tecido estão presentes dois sistemas principais originados de linhagens distintas - o próprio tecido hematopoiético e o estroma de suporte associado. As células mesenquimais (ou estromais) isoladas a partir da medula óssea são progenitoras de componentes estruturais e fornecem o estroma de suporte da hematopoiese. Além da medula óssea, vários outros tecidos possuem suas próprias CT mesenquimais, como sangue periférico, tecido adiposo, polpa dentária, bulbo olfatório (fonte de linhagens neurogênicas), tendões, músculo esquelético e cardíaco. Essas células podem ser obtidas do próprio paciente para utilização terapêutica sem gerar tanta controvérsia nos aspectos de acessibilidade, praticidade e ética, e por isso têm atraído a atenção e os esforços de pesquisadores de diversas áreas.

As células-tronco da medula óssea (CTMO) têm a capacidade de diferenciação em outras linhagens celulares específicas, incluindo células neurais, quando transplantadas em roedores, canídeos e humanos, e em modelos experimentais *in vitro*. Embora não esteja claro ainda qual fração das CTMO é mais propensa a se diferenciar em tipos celulares de diferentes origens embrionárias *in vivo*, a transdiferenciação de CTMO em células neurais merece atenção especial, e isso se deve à potencial importância desse evento biológico em terapias regenerativas para distúrbios cerebrais e espinhais.

As CT adultas ainda são definidas segundo o tecido de onde são coletadas como, por exemplo, CT mesenquimais de medula óssea, CT de tecido adiposo, CT de tecido nervoso, dentre outras. Para a aquisição de culturas celulares puras, independente de sua origem, essas células devem ser separadas e dispostas em garrafas de cultura de tecidos específicas para esse fim. Nesse ambiente controlado, as células secretam uma matriz extracelular que se sobrepõe ao plástico da garrafa, à qual aderem, apresentando morfologia semelhante a de fibroblastos. Uma vez em cultivo, essas células podem ser empregadas segundo a necessidade do pesquisador. No instante do seu uso, as células são liberadas da garrafa e acondicionadas conforme a necessidade. As células podem ser também criopreservadas em nitrogênio líquido para empregos futuros. Geralmente as células descongeladas apresentam taxas de viabilidade superior a 90% quando o método de congelamento é bem empregado.

A expressão de determinadas proteínas na membrana ou de proteínas intracelulares é utilizada na caracterização dos diferentes tipos de células-tronco. A

imunoistoquímica é uma das principais técnicas empregadas na fenotipagem celular. Uma vez incubadas com anticorpos específicos para os marcadores de interesse como, por exemplo, proteínas neurais específicas (NeuN, NSe, NF-70, MAP-2, GFAP e GalC), uma coloração diferente dessas células pode ser revelada nos preparados histológicos permitindo a sua identificação dentre as demais células. Infelizmente, para a medicina veterinária, especialmente em cães e em gatos, a maioria dos marcadores não está disponível para uso comercial.

Outra ferramenta amplamente utilizada é a citometria de fluxo que, assim como na imunoistoquímica, é capaz de identificar marcadores de superfície ou proteínas intracelulares, a sua taxa de proliferação e ainda separar as diversas populações celulares. Nessa técnica, os anticorpos monoclonais são conjugados com fluorocromos contra os marcadores que se pretende avaliar, como por exemplo, moléculas presentes nas diferentes populações leucocitárias (CD14, 16, 44, 45, 49d, 62e, 105 e 106).

As CT também podem ser caracterizadas quanto ao seu potencial de diferenciação *in vitro*. Os ensaios de diferenciação seguem protocolos de indução em tipos celulares distintos com a administração de fatores de crescimento apropriados ou outros sinalizadores externos. Alguns dos meios de diferenciação mais amplamente empregados encontram-se listados na Tabela 56.1.

Tabela 56.1 Meios de diferenciação de linhagens específicas

Meio de diferenciação	Meio de cultivo	Soro	Suplementação
Controle	DMEM	10% SBF	Nenhuma
Meio adipogênico	DMEM	10% SBF	0,5 mM isobutil-metilxantina (IBMX), 1 mM dexametasona, 10 mM insulina, 200 mM indometacina, 1% antibiótico/antimicótico
Meio osteogênico	DMEM	10% SBF	0,1 μ M dexametasona, 50 mM ascorbato-2-fosfato, 10 nM β -glicerofosfato, 1% antibiótico/antimicótico
Meio condrogênico	DMEM	10% SBF	6,25 μ g/mL insulina, 10 ng/mL TGF β 1, 50 nM ascorbato-2-fosfato, 1% antibiótico/antimicótico
Meio miogênico	DMEM	10% SBF	50 μ M hidrocortisona, 1% antibiótico/antimicótico
Meio neurogênico	DMEM	Nenhuma	5-10 mM 2-mercaptoetanol

DMEM; Dulbecco's Modified Eagle's Medium; SBF; Soro Bovino Fetal. (Zuk *et al.*, 2002; Mizuno & Hyakusoku, 2003; Wagner *et al.*, 2005).

2.1.1. Migração e ativação de células-tronco residentes

A migração, ou *homing* celular, ocorre principalmente mediada por citocinas e quimiocinas, de forma similar a já bem conhecida quimiotaxia leucocitária pró-inflamatória. Ainda não estão completamente elucidados quais são os mediadores, as células que os secretam e sob quais condições ocorre a secreção desses fatores. É possível que o microambiente tecidual extra-hematopoiético resultante de apoptose ou necrose permita um enxerto eficiente das CT circulantes, onde estas seletivamente visam ao tecido lesionado e promovem sua recuperação funcional.

Algumas dessas citocinas são conhecidas e estão aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration), Ministério da Saúde e agências reguladoras para uso clínico, como é o exemplo do fator estimulador de colônia de granulócito (do inglês G-CSF: Granulocyte - Colony Stimulating Factor. Nomes comerciais: Filgrastin, Granulokine). O G-CSF é uma glicoproteína descrita há mais de 20 anos, empregada atualmente no tratamento de neutropenia induzida por agentes quimioterápicos e na mobilização de CT da medula óssea para o sangue periférico para utilização em transplante de medula óssea.

O G-CSF estimula CT hematopoéticas e regula crucialmente a sobrevivência de neutrófilos maduros, pós-mitóticos, através da inibição da morte celular programada: a apoptose. A sua capacidade de mobilização de células-tronco e progenitores da medula óssea para o sangue periférico favorece a sua migração para áreas lesadas em outros órgãos. Sua atividade pode ser caracterizada como multimodal, pois, além dos seus efeitos na mobilização de CT, possui efeitos citoprotetores através de diferentes mecanismos, tais como a atividade antiapoptótica, neovascularização, ação anti-inflamatória e imunomoduladora. Inicialmente, foi empregado em distúrbios hematológicos e é, atualmente, objeto de pesquisa no tratamento de afecções imunológicas, infarto de miocárdio, regeneração de células beta no pâncreas, hepatite, acidente vascular cerebral, doenças neurodegenerativas (como ELA – esclerose lateral amiotrófica), mieloma e outros tumores.

Outros exemplos de mediadores da migração celular são os fatores derivados de plaquetas. Eles podem ser obtidos a partir do emprego de plasma rico em plaquetas (PRP) ou também conhecido como gel de plaquetas, consorciado ou não ao emprego de CT tanto em ensaios *in vitro*, quanto *in vivo*. O PRP tem seu efeito justificado a partir da degranulação plaquetária em locais de dano tecidual e liberação de diversos fatores de crescimento e citocinas.

Foram identificados pelo menos sete diferentes fatores de crescimento secretados ativamente pelas plaquetas que atuam na fase inicial da cicatrização. São eles: três isômeros do fator de crescimento plaquetário (PDGF) – PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$ e PDGF $\alpha\beta$ –, dois fatores de crescimento transformadores (TGF) – TGF β 1 e TGF β 2 –, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento epitelial (EGF) e o fator de crescimento similar à insulina (IGF-1). A técnica do PRP constitui uma importante ferramenta terapêutica,

especialmente em ortopedia, odontologia e oftalmologia, devido à facilidade de obtenção e aos seus potenciais benefícios na regeneração tecidual.

3. Utilização das Células-tronco

Quebrando paradigmas e gerando discussões amplas, as CT mesenquimais obtidas da medula óssea podem dar origem a neurônios e a outras células habitantes do sistema nervoso central, bem como as CT oriundas de nervos periféricos ou centrais podem ser empregadas para hematopoiese. Atualmente, CT embrionárias podem ser obtidas a partir de manipulação de células somáticas e não necessariamente existe a necessidade de uma fonte externa de CT para se realizar uma terapia celular. Então por onde começar? A chave para a melhor indicação das terapias celulares está na bioengenharia, na imunologia e na farmacologia.

Hoje, a engenharia tecidual fundamentada no emprego direto de CT apresenta resultados clínicos bastante animadores nos campos de angiogênese, osteo e condrogênese, regeneração em córnea, dentina, músculo cardíaco, fígado, pâncreas, tecido nervoso, músculo esquelético e pele. Entretanto, a fonte (facilidade de obtenção e capacidade de diferenciação) das CT não deve ser o único fator levado em conta no momento da seleção da melhor terapia a ser instituída, mas também o microambiente onde elas serão implantadas, as citocinas secretadas, a via de administração, a dose terapêutica e o tempo disponível/necessário para o tratamento. Por uma questão de bom senso, a primeira pergunta a ser respondida deveria ser: o que se pode esperar com o tratamento que pretendo instituir?

Em casos como o de infarto agudo de miocárdio, o que se pretende é neovascularização e citoproteção. Parte desse objetivo é obtido a partir de fusão celular associada a efeitos parácrinos e da maneira mais rápida possível. Dessa maneira, as CT autólogas devem ser mobilizadas no menor período e com a maior eficiência possível. Deve-se levar em consideração também a escolha da via de administração menos invasiva. Isso pode ser obtido com o emprego de G-CSF associado ou não ao emprego de CMTO autólogas indiferenciadas na região lesionada, de forma minimamente invasiva. Perceba, porém, que na opção do uso consorciado há uma demanda maior de recursos e tempo para realização da terapia. Aqui as células precisariam inicialmente ser colhidas, cultivadas, fenotipadas e somente depois administradas por via venosa ou arterial, ou injeção intramiocárdica. Os graus de dificuldade são outros.

Essa situação é bem diferente quando o objeto de tratamento é uma não união óssea, em que o emprego de um arcabouço celular confeccionado com gel de plaquetas autólogo associado à CTMO por uma via cirúrgica convencional demonstrou resultados excepcionais. Nesse caso, como vem sendo empregado há mais de duas décadas, o emprego de enxerto esponjoso autólogo pode ser uma segunda opção ao emprego das CTMOs, uma vez que existe um tempo

médio para o cultivo celular. No cão, este tempo de cultivo é algo em torno de 7 dias e no gato 10 dias para que seja atingido um número mínimo de células a serem administradas produzindo efeito terapêutico. Os efeitos desse tratamento têm variado de autor para autor, porém não menos do que 10^4 células/cm³ de lesão são recomendadas como dose terapêutica.

Em tecidos de atividade biológica consorciada, como é o caso do coração (muscular + neurológico), é interessante e intuitivo perceber que, se parte do tecido muscular for simplesmente substituído por outro, não se levando em consideração o tecido nervoso, provavelmente a sua função deveria ser, pelo menos em parte comprometida. A partir do emprego de células transplantadas com marcadores específicos e até mesmo na forma de quimeras¹, observou-se que o coração doente passou a apresentar características mistas das células do hospedeiro e das administradas. A partir de observações do comportamento fenotípico destas células em cultura, descreveu-se o mecanismo de ação de fusão celular. Essa proposta é particularmente aceita como resposta em casos de tratamento para o infarto agudo de miocárdio em algumas espécies, além de ser empregado em outros tratamentos de moléstias agudas como AVE (acidente vascular encefálico) e pancreatite.

O potencial de aplicação clínica das CTMO diferenciadas em tipos celulares não hematopoiéticos é bastante amplo. Células progenitoras da medula óssea podem ser usadas para tratar lesão tecidual e doenças múltiplas de tecidos não hematopoiéticos em pelo menos quatro caminhos: transplante de células autólogas normais, reforço ou mobilização de CT endógenas, transplante de células autólogas geneticamente modificadas, e o transplante de células de MO alogênicas. Para algumas aplicações, as células devem ser diretamente administradas no tecido não hematopoiético e, para outros, o benefício clínico pode ser melhor com a aplicação dessas células na própria medula do paciente. As CTMO endógenas podem normalmente ter um papel no reparo de danos teciduais discretos. A administração de CTMO exógenas pode ser vantajosa no reparo de tecidos quando os mecanismos de reparação endógena estão sobrepujados pela extensão da lesão, ou mesmo quando as CTMO não têm acesso à área acometida, por estarem presentes graves ferimentos ou comprometimento vascular.

Diversos trabalhos sugerem que células da MO podem diferenciar-se em células do SNC, incluindo neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*. Foi demonstrado também, pelo registro eletrofisiológico, que as CTMO se diferenciaram em células com corrente iônica sensível à voltagem, indicando presença de neurônios eletricamente ativos.

¹Células modificadas geneticamente para expressar características que as diferenciem no meio de cultura. Um exemplo muito bom de quimera envolve a expressão da proteína verde fluorescente (GFP) em células-tronco. Com isso é possível acompanhar linhagens celulares a partir da visualização direta destas em cortes histológicos ou culturas de células, através de microscopia de fluorescência.

Já em estudos em tecido *post mortem* de mulheres que necessitaram receber transplante de MO de homens, foi possível demonstrar que as células transplantadas positivas para o cromossomo Y deram origem a neurônios nas pacientes transplantadas. Não se pode definir, entretanto, qual população das células da MO adentrou o SNC e se diferenciou em células que expressavam marcadores e apresentavam morfologia neuronal, visto que as pacientes receberam células obtidas da fração total da medula óssea (hematopoéticas e mesenquimais). Com base em morfologia nuclear, tamanho e localização, pode-se observar que a minoria dessas células era neurônio e o restante era uma mistura de oligodendrócitos, astrócitos e possivelmente células da micróglia. A distribuição dessas células não era randômica, já que apareceram agrupadas em uma distribuição espacial que sugere que células não diferenciadas migraram para uma “área de necessidade” e depois passaram por divisões assimétricas para produzir diferentes linhagens celulares. Esses achados reforçam o conceito de *homing* celular.

Além de migração e diferenciação celulares visualizadas em modelos de doenças neurológicas, foi demonstrada a recuperação clínica por mecanismos ainda sendo elucidados. As vias intravenosas, *in locu* lesional e paralesional são as mais frequentemente utilizadas. Em modelos de lesão traumática cerebral, observou-se a migração tanto de células injetadas por via venosa quanto de células autólogas residentes para as áreas de lesão em ratos que receberam as CTMO. Apesar de células derivadas do doador no parênquima cerebral expressarem proteínas específicas de neurônios ou astrócitos (NeuN ou *glial fibrillary acidic protein* – GFAP), sugerindo que elas podem funcionar como células neuronais ou astrocíticas, essas células não restabeleceram a citoarquitetura normal do tecido. O mais interessante desse achado é que mesmo na ausência da arquitetura desejada, as funções do tecido passam por melhora clínica perceptível.

Hoje, um amplo número de trabalhos envolvendo pesquisa clínica está disponível na literatura. Ganhos clínicos distintos são observados em espécies diferentes e, principalmente, como resultado dos métodos investigativos empregados. Talvez esteja na comparação entre os resultados de trabalhos distintos a maior dificuldade encontrada entre pesquisadores. As equipes que trabalham com terapia celular são, em sua maioria, multidisciplinares, e a transposição de resultados de um modelo para outro é uma tarefa nem sempre bem aceita pela comunidade científica. Assim, são encontrados trabalhos com métodos dos mais variados, envolvendo diferentes vias de administração, doses terapêuticas, fontes de aquisição das células, arcabouço celular e fármacos associados.

4. Terapia Celular na Veterinária

Em veterinária, o uso de células-tronco tem sido sugerido na tentativa de reparo tecidual em algumas doenças, tais como na promoção de neovascularização



FIGURA 56.1 Paciente anestesiado e preparado para cirurgia de retirada das células-tronco. (Intensivet Núcleo de Medicina Veterinária Avançada).

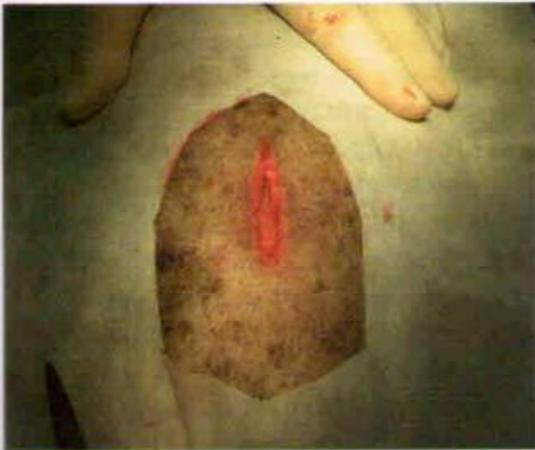


FIGURA 56.2 Campo operatório preparado, na base da cauda, para retirada do tecido. (Intensivet Núcleo de Medicina Veterinária Avançada).



FIGURA 56.3 Paciente em implantação das células-tronco (sete dias após cultivo celular - Bio Tecnologia Animal, Brasília/DF), para tratamento de artrose crônica em joelho. (Intensivet Núcleo de Medicina Veterinária Avançada).

pulmonar em cães com hipertensão pulmonar primária, aceleração do processo de consolidação de fraturas no cão e no gato, diminuição das dores osteoarticulares decorrentes de artrose nas espécies canina (Figs. 56.1, 56.2, 56.3), felina e equina, reparo de tendões em equino; infarto de miocárdio no cão e no gato, lesões raquimedulares no cão e no gato, úlcera de córnea no cão e no equino.

A hipertensão pulmonar primária no cão é uma doença refratária onde há piora clínica do paciente a despeito de qualquer tratamento. A melhora clínica após a terapia com fração mononuclear de medula óssea foi relacionada a efeitos benéficos na pressão arterial pulmonar, no débito cardíaco e na resistência vascular pulmonar. Histologicamente, revelou-se melhora na espessura média da artéria pulmonar e uma neovascularização do parênquima pulmonar.

A recuperação de tecido ósseo lesado de cães tratados com implantes de cilindros de hidroxiapatita enriquecidos com CTs foi demonstrada a partir da aceleração no processo de reparo de fraturas em fêmur e de tibia de cães e uma melhora significativa na resolução de transplantes ósseos em cães e em gatos. Ressalta-se, ainda, a rapidez, simplicidade e segurança da utilização de hidroxiapatita associada a CTs nos transplantes, o que favoreceu ainda o aumento da concentração de células progenitoras em até várias vezes em comparação com transplantes utilizando somente matriz óssea. A não união óssea também se tornou alvo de tratamento por CTMO. Pacientes acometidos por não união óssea na diáfise da tibia foram tratados com a FCMMO (fração de células mononucleares da medula óssea), aplicada por via percutânea no foco da alteração óssea. Foi observada a reversão da não união e a consolidação óssea em 88% dos casos, e o sucesso do tratamento foi proporcional à concentração celular obtida. Outra forma de tratamento de não união utilizando CT mesenquimais cultivadas e expandidas em laboratório, na dose de 10^6 células mL^{-1} , realizando aplicação única por aplicação percutânea, ou múltipla associada a arcabouços celulares distintos (como aloimplante de osso cortical preservado, osso liofilizado, gel de plaquetas) observou que a terapia com a fração mononuclear de medula óssea provenientes da medula óssea mostrou-se efetiva para a estimulação osteogênica de não união de fraturas, promovendo a união óssea em pacientes que apresentavam um ano ou mais de fratura e diversas cirurgias anteriores fracassadas.

Doenças cardíacas crônicas como a isquemia e patologias cardíacas hipertensivas são caracterizadas pela perda irreversível de cardiomiócitos. O conceito geral, aceito pela cardiologia contemporânea, é que cardiomiócitos em adultos perdem a habilidade de regenerar o miocárdio, o que leva ao desenvolvimento e progressão da falha cardíaca. Em estudos sobre regeneração de miocárdio em cães, após indução de infarto pela oclusão de artéria coronária esquerda descendente, foi observada uma progressiva melhora da função cardíaca com o uso de células progenitoras cardíacas. Os autores afirmam que a técnica foi capaz de ativar a reserva de crescimento de miocárdio mostrando ser esta uma importante estratégia de reparo cardíaco após lesões isquêmicas.

Em outro modelo de isquemia miocárdica em cães, demonstrou-se melhora na morfologia e na função cardíaca após transplante de CT derivadas de medula óssea. Em modelo com camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, observou-se a diminuição do infiltrado inflamatório e da fibrose característica da cardiomiopatia chagásica crônica após o tratamento com as CTMO. Graças a esses resultados, a metodologia foi extrapolada para a espécie humana em um estudo inicial e pioneiro, em que pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica apresentaram melhora da função cardíaca e da qualidade de vida 6 meses após o transplante.

Terapias com CTMO também vêm sendo empregadas no reparo de lesões nervosas periféricas e centrais (tanto no cérebro quanto na raquimedula). Resultados promissores em ratos e em humanos estão sendo encontrados no tratamento da epilepsia e de lesões isquêmicas. No cão e no gato também estão descritos resultados favoráveis na reconstrução de nervo periférico além de repostas clínicas em lesões raquimedulares em casos clínicos, cronicamente tratados.

Sob o aspecto imunológico, alguns autores descrevem o efeito imunoprotetor da terapia, especialmente com CT mesenquimais. O principal mecanismo de ação proposto é a imunossupressão da proliferação de linfócitos T e linfócitos B, da produção de citocinas e atividade citotóxica de células *natural killer*. Dadas suas características imunomoduladoras, juntamente com suas propriedades de trofismo tecidual, as CTM são candidatas para utilização no tratamento de doenças autoimunes (DAI). Diferentes modelos pré-clínicos de DAI demonstram os efeitos benéficos de CTM no tecido lesado, inibindo a inflamação e promovendo a reparação tecidual através de mecanismos tróficos e antiapoptóticos. Embora estes resultados abram caminho para a concepção dos ensaios clínicos nestes doentes com CTM, os estudos publicados até o momento são poucos em número.

Dessa forma, as CT tornam-se interessantes candidatas a agentes terapêuticos no reparo tecidual e na terapia de doenças de diversas causas. Contudo, o uso clínico de CT adultas pode apresentar algumas dificuldades. A possibilidade do estado de morbidade do paciente interferir no rendimento de células pode ocasionar a recuperação de um baixo número de células por punção. Isso aumenta o tempo de cultura requerido para gerar a dose terapêutica celular. A recuperação de quantidade satisfatória de células e o potencial de proliferação dessas células podem também sofrer interferência de fatores do doador, tais como idade, sexo, massa corpórea ou tratamentos com drogas.

O interesse por modelos experimentais que permitam investigar a viabilidade de terapias celulares em doenças cardíacas aumentou muito. O desenvolvimento de terapias eficazes no tratamento das doenças caninas, como as cardiopatias, representa não apenas um grande avanço no campo da clínica veterinária, como também um progresso na área da ciência básica, que busca investigar os mecanismos patogênicos das cardiopatias em humanos e a terapêutica eficaz para essa síndrome.

Considerando essas perspectivas da terapia de cães com células-tronco, há uma demanda por estudos rigorosos e extensos além de validações independentes. Questões como: (1) de que forma as células se comportam após o transplante; (2) há possibilidade dessas células se transformarem em outro tipo celular que leve a efeitos deletérios (a exemplo de células tumorais); (3) poderão as células transplantadas receber estímulos de células vizinhas e ainda assim diferenciarem apropriadamente; e (4) seria interessante um transplante com células pré-diferenciadas ou indiferenciadas ainda precisam ser respondidas para a definição das melhores opções terapêuticas para cada caso.

5. Considerações Finais

A terapia celular é uma área promissora no que concerne ao emprego de terapias chamadas regeneradoras e pode em um futuro breve passar a fazer parte da rotina médica-veterinária. Em diversas áreas, protocolos envolvendo CT das mais diversas origens se mostram eficientes e são empregadas em ensaios pré-clínicos com excelentes resultados. Apesar dos resultados, o conhecimento do que realmente está acontecendo e das perspectivas de manipulação celular eficientes ainda se encontram incipientes.

A caracterização e aquisição de conhecimentos sobre as propriedades e manejo das células-tronco de cães e gatos domésticos representam condições básicas para a pesquisa clínica da terapia celular nestas espécies e para o estabelecimento de um protocolo adequado para um tratamento eficaz. Assim, antes de se incluir essa técnica na prática clínica de rotina, questões básicas serão respondidas, a exemplo da caracterização funcional e fenotípica das células isoladas e de suas progênes. A partir de então, o emprego desse novo recurso poderá ser mais bem entendido e os seus recursos mais bem aplicados na rotina médica veterinária.

6. Literatura Sugerida

1. Archer, D.R.; Cudon, P.A.; Lipsitz, D.; Duncan, I.D. Myelination of the canine central nervous system by glial cell transplantation: a model for repair of human myelin disease. *Nature Medicine*, v. 3, n. 1, p. 54 - 59, 1996.
2. Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*. v:85, p.:1927-35, 2003.
3. Brazelton, T. R.; Rossi, F. M. V.; Keshet, G. I.; Blau, H. M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, v. 290, p. 1775 - 1779, 2000.
4. Chopp, M.; Li, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurology*, v. 1, p. 92 - 100, 2002.
5. Costa, C.M.C.; Araújo, A.Q.C.; Barreto, M.M.; Oliveira, A.C.P. Guia de manejo clínico do paciente com HTLV. Aspectos Neurológicos. *Arq Neuropsiquiatr*. v.63, n.2-b, p.548-551, 2005.
6. Defino, H.L.A. Trauma Raquimedular. *Medicina*, Ribeirão Preto. v.32, n.6, p.388-400, 1999.
7. Ettinger, S. J.; Feldman, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária Moléstias do cão e do gato, 4ª edição, v.1, Manole, 1997.

8. Goolsby, J.; Marty, M. C.; Heletz, D.; Chiappelli, J.; Tashko, G.; Yarnell, D.; Fishman, P.S.; Dhib-Jalbut, S.; Bever, Jr., C. T.; Pessac, B.; Trisler, D. Hematopoietic progenitors express neural genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, p. 14926 - 14931, 2003.
9. Grove, J. E.; Bruscia, E.; Krause, D. S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*, v. 22, p. 487 - 500, 2004.
10. Grzesiuk, A.K. Características clínicas e epidemiológicas de 20 pacientes portadores de esclerose múltipla acompanhados em cuiabá - mato grosso. *Arq Neuropsiquiatr*. v.64, n. 3-a, p.635-638, 2006.
11. Hassink RJ, Brutel de la Riviere A, Mummery CL, Doevendans PA. Transplantation of cells for cardiac repair – Review. *J Am Coll Cardiol*. v: 5;p.:711-7, 2003.
12. Herzog, E.L.; Chai L.; Krause, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, v. 102, p. 3483 - 3493, 2003.
13. Hung, S. C.; Cheng, H.; Pan, C. Y.; Tsai, M. J.; Kao, L. S.; Ma, H. L. In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. *Stem Cells*, v. 20, p. 522 - 529, 2002.
14. Kadiyala S, Young, S.R., Thiede, M.A. and Bruder, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* v: 6, p. 125-134, 1997.
15. Keirstead, H.S.; Ben-Hur, T.; Rogister, B.; O'leary, M. T.; Dubois-Dalcq, M.; Blakemore, W. F. Polysialylated neural cell adhesion molecule-positive CNS precursors generate both oligodendrocytes and schwann cells to remyelinate the CNS after transplantation. *The Journal of Neuroscience*; v. 19, n.17, p. 7529 – 7536, 1999.
16. Lin, H. Stem cells: to be and not to be. *Nature*, v. 425, p. 353 - 355, 2003.
17. Lindvall, O.; Kokaia, Z.; Martinez-Serrano, A. Stem cells therapy for human neurodegenerative disorders – how to make it work. *Nature Medicine*, v. 10, p. S42 -S50, 2004.
18. Linke, A.; Patrick Muller, P.; Nurzynska, D.; Casarsa, C.; Torella, D.; Nascimbene, A.; Castaldo, C.; Cascapera, S.; Böhm, M.; Quaini, F.; Urbanek, K.; Leri, A.; Hintze, T.H.; Kajstura, J.; and Anversa, P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *PNAS*, v.21, p. 8966-8971, 2005.
19. Mahmood, A.; Lu, D.; Wang, L.; Li, Y.; Lu, M.; Chopp, M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*, v. 49, p.1196 – 1204, 2001.
20. McKay, R. Stem Cells in the Central Nervous System. *Science*, v. 276, p. 66 - 71, 1997.
21. Mezey, E.; Key, S.; Vogelsang, G.; Szalayova, I.; Lange, G. D.; Crain, B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 3, p. 1364 – 1369, 2003.
22. Muñoz-Elias, G.; Marcus, A. J.; Coyne, T. M.; Woodbury, D.; Black, I. B. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *The Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 19, p. 4585 – 4595, 2004.
23. Muñoz-Elias, G.; Woodbury, D.; Black, I. B. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem Cells*, v. 21, p. 437 - 448, 2003.
24. Muschler GF, Matsukura Y, Nitto H, Boehm CA, Valdevit AD, Kambic HE, Davros WJ, Easley KA, Powell KA. Selective retention of bone marrow-derived cells to enhance spinal fusion. *Clin Orthop Relat Res*. v: 432, p.:242-51, 2005.
25. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, Davros W, Powell K, Easley K. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res*. v: 407, p.:102-18, 2003.
26. Penha, EM; Aguiar, PHP; Barrouin-Melo, SM; Lima, RC; Silveira, ACC; Otelo, ARS; Pinheiro, CMB; Ribeiro-Dos-Santos, R; Soares, MBP. Cellular therapy and hemilaminectomy in clinical neurofunctional rehabilitation of a cat with raquimedular lesion: a case report. *Proceedings: II simpósio internacional de terapias avançadas & células-tronco*, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://www.interevent.com.br>
27. Plasat-Benard, V., Menard, C., Andre, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.M., Penicaud, L. & Casteilla, L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation Res*, v: 94, p: 223-229, 2004a.

28. Pluchino, S.; Zanotti, L.; Deleidi, M.; Martino, G. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Research Reviews*, v. 48, p. 211 – 219, 2005.
29. Rice, C.; Halfpenny, C.; Scolding, N. Cell therapy in demyelinating diseases. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, v. 1, n. 4, p. 415 - 423, 2004.
30. Silva, GV; Litovsky, S; Assad, JAR; Sousa, ALS; Martin, BJ; Vela, D; Coulter, SC; Lin, J, Ober, J; Vaughn, WK; RVC; Oliveira, EM; He, R; YJ; Willerson, JT; Perin, EC. Mesenchymal Stem Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Canine Chronic Ischemia Model. *Circulation* v.:18, p.: 150-156, 2005.
31. Soares, M.B.; Lima, R.S.; et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol*, v.164, p.441-447, 2004.
32. Takahashi M, Nakamura T, Toba T, Kajiwara N, Kato H, Shimizu Y. Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs. *Tissue Eng.* v:10, p.:771-9, 2004.
33. Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. and Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res* v.61, p: 364-370, 2000.
34. Zurita, M.; Vaquero, J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neuroscience Letters*, v. 402, p. 51 – 56, 2006.

ANEXO II – MATERIAL SUPLEMENTAR (VÍDEOS)

Encontram-se em anexo dois vídeos que foram entregues como material suplementar aos manuscritos II e III demonstrando os resultados da terapia células em um cão e em um gato, respectivamente.