



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**



**MARCUS VINÍCIUS PINHEIRO MENDONÇA**

**TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO  
DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM  
TRAUMA RAQUIMEDULAR**

Feira de Santana, BA

2014

**MARCUS VINÍCIUS PINHEIRO MENDONÇA**

**TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO  
DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM  
TRAUMA RAQUIMEDULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Milena Botelho Pereira Soares

Feira de Santana, Bahia

2014

Dedico esta trabalho aos pacientes que fizeram parte deste experimento, que sua coragem e dedicação possam ajudar a outros.

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Noraldo Camargo Mendonça e Rizzo Pinheiro Mendonça, pela liberdade que me foi dada, de ser e agir.

À minha irmã Geanne Mendonça pelas oportunidades e pelo seu exemplo que influencia e permeia a minha vida.

À minha esposa Mariana Carvalho Costa Mendonça, companheira em todos os momentos.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Milena Botelho Soares pelo aprendizado nestes anos de convivência e pela confiança.

Ao Dr Ricardo Ribeiro pela confiança e brilhantismo.

Ao parceiro e amigo Bruno Solano, além de uma amizade e toda a ajuda possível, pelo raro exemplo de integridade e lealdade.

À Ticiania Laroccapela amizade prévia a este trabalho, pela dedicação ao projeto e aos pacientes.

Ao amigo Euler Moraes Penha pela amizade e pela oportunidade de trabalharmos juntos por todos esses anos.

Aos colegas do CBTC.

Aos parceiros Josildo Marins Filho e Cristian Alves Felizardo pelo apoio incondicional.

À Dr<sup>a</sup> Carla Kaneto e aos colegas da pós-graduação em Biotecnologia.

Aos colegas radiologistas Dr. José Luiz, Dr. José Carvalho e Dr. Saulo Fernandes, pela ajuda inestimável neste trabalho.

Ao secretário Helton Ricardo pela paciência e dedicação.

Ao amigo Luiz Flávio Maiapela dedicação a este projeto.

“Se as portas da percepção estivessem abertas, tudo se mostraria  
ao homem como realmente é, infinito em si mesmo. Pois  
o homem encerrou-se em si, a ponto  
de ver tudo pelas estreitas fendas da sua caverna.”

Willian Blake

## RESUMO

A despeito do avanço na assistência do paciente com trauma raquimedular, atualmente não há tratamento específico para a lesão neurológica. A terapia com células-tronco mesenquimais da medula óssea (CMMO) tem-se mostrado uma técnica segura e promissora em diversas áreas médicas. O objetivo deste estudo é avaliar a segurança do transplante autólogo de CMMO para o tratamento de lesão medular crônica de origem traumática. Foram selecionados 14 pacientes paraplégicos (classificados como A na escala ASIA) com lesão medular torácica ou tóraco-lombar há mais de 6 meses. Eles foram inicialmente submetidos à aspiração de tecido da medula óssea da crista íliaca, com posterior expansão e caracterização *in vitro* de CMMO e, por meio de procedimento microcirúrgico, introduziu-se a suspensão de CMMO na medula espinhal no nível da lesão. Os pacientes foram acompanhados clinicamente, com realização de exames funcionais e de imagem por um período de 6 meses após o procedimento cirúrgico. Houve mudança na escala ASIA em 7 pacientes, aumento da capacidade vesical em 5 pacientes e aparecimento de onda ao SSEP em 1 paciente. Durante todo o tempo de observação, não foram identificadas complicações potencialmente graves. O presente protocolo se mostrou seguro e, ainda, devido a melhoras significativas no quadro neurológico em boa parte dos pacientes, um método terapêutico potencialmente promissor para pacientes com trauma raquimedular.

**Palavras-chave:** Trauma raquimedular. Células-tronco mesenquimais. Transplante.

## ABSTRACT

Despite the advancement in the care of patients with spinal cord injury, currently there is no specific treatment for neurological lesion. Therapy with mesenchymal stem cells from bone marrow (BMSC) has shown to be a safe and promising technique in various medical fields. The objective of this study is to evaluate the safety of autologous BMSC transplantation for the treatment of chronic spinal cord injury of traumatic origin. Fourteen paraplegic patients (classified as A in ASIA scale) with at least 6-month thoracic or thoracolumbar spinal cord injury were selected. They underwent aspiration of bone marrow tissue from the iliac crest with further expansion and *in vitro* characterization; by means of microsurgical procedure, the BMSC suspension was introduced at the level of the spinal cord injury. A 6-month clinical follow-up was performed after surgery, including functional and imaging tests. There was a change in ASIA scale in 7 patients, increased bladder capacity in 5 patients and appearance of the SSEP waveform in one patient. Throughout the observation period, no major complications were observed. The present protocol proved to be safe and, due to significant improvements in neurological symptoms in many patients, also a potentially promising therapeutic method for patients with spinal cord injury.

**Keywords:** spinal cord injury, mesenchymal stem cells, transplant.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Fig 1: Histopatologia da lesão medular

Fig 2: Histopatologia da lesão neuronal

Fig 3: Fenótipos de macrófagos e mecanismo de ação

Fig 4: Histopatologia da cicatriz astrogliar

Fig 5: Potenciais mecanismos de regeneração

Tabela 1: Comparação entre estudos clínicos de terapia celular em lesão raquimedular

## LISTA DE ABREVIACÕES

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ASIA: American Spine Injury Association

AVC: Acidente vascular cerebral

BBB: Escala Basso, Beattie, Bresnahan

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

BFGF: fator de crescimento fibroblástico básico

CMMO: Célula mesenquimal de medula óssea

COVS: Escala de resultados clínicos variáveis

CPG: Centro gerador de padrão

FIM: Medição da independência funcional

GCS-F: Fator estimulador de colônias granulocíticas

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

HGF: Fator de crescimento hepático

HE: Hematoxilina-eosina

IADL: Atividades instrumentais de vida diária

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

ICAM-1: Molécula de adesão celular 1

IL-1  $\beta$ : Interleucina 1  $\beta$

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IPSC: Células-tronco pluripotente induzidas

MEP: Potencial evocado motor

NF $\kappa$  B: Fator nuclear  $\kappa$  B

NGF: Fator de crescimento neuronal

NIH: National Institute of Health

NMDA: N-metil d-aspartato

NSCI: National Spinal Cord Injury Association

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PVSEP: Potencial evocado sensitivo paravertebral

RNM: Ressonância nuclear magnética

SNC: Sistema Nervoso Central

SSEP: Potencial evocado somato sensitivo

STAT 3: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

SUR 1: Receptor de sulfoniuréia 1

TRM: Trauma raqui-medular

TGF- $\beta$ : Fator de transformação do crescimento  $\beta$

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. OBJETIVOS</b>	14
2.1. OBJETIVO PRIMÁRIO	15
2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	15
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b>	16
3.1. TRAUMA RAQUIMEDULAR (TRM)	16
3.2. EPIDEMIOLOGIA DAS LESÕES RAQUIMEDULARES	16
3.3. FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES RAQUIMEDULARES	18
3.4. TRATAMENTOS	25
3.5. TERAPIA CELULAR	27
3.6. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	29
3.7. TERAPIA CELULAR E LESÃO RAQUIMEDULAR	31
3.8. ESTUDOS CLÍNICOS DE TERAPIA CELULAR EM LESÃO RAQUIMEDULAR	34
<b>4. ARTIGO</b>	36
4.1. INTRODUÇÃO	39
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.3. RESULTADOS	48
4.4. DISCUSSÃO	52
4.5. REFERÊNCIAS	57
4.6. ANEXOS	60
<b>5. DISCUSSÃO</b>	68
<b>6. CONCLUSÕES</b>	79
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	80
<b>8. ANEXOS</b>	97

## 1. INTRODUÇÃO

As lesões do Sistema nervoso central (SNC) tem como característica um comprometimento funcional significativo em um número expressivo de indivíduos. Observamos nas últimas décadas uma evolução no atendimento do paciente com lesão neurológica aguda, como na sistematização do atendimento ao traumatizado medular (STAHEL *et al*, 2012) bem como nos procedimentos de trombólise em relação ao acidente vascular cerebral agudo (SCHMITZ *et al*, 2014). Apesar da evolução dos cuidados médicos não há efetividade no tratamento da lesão neurológica estabelecida.

Dentre as lesões do SNC a lesão medular modifica de forma aguda a capacidade de mobilidade e interação do indivíduo. Na maioria dos casos, famílias inteiras são mobilizadas para o acompanhamento e tratamento do paciente com déficit neurológico. O custo direto da manutenção do primeiro ano após o acidente de um paciente com lesão medular cervical dependente de ventilação mecânica pode chegar a um milhão de dólares (NSCI, 2012).

A evolução tecnológica, associada ao aumento populacional nas grandes cidades, ocorridos na sociedade ocidental no último século, teve como reflexo o aumento exponencial dos casos de traumatismos raquimedulares relacionados à violência civil urbana e a acidentes com veículos automotores. A incidência do trauma raquimedular nos países desenvolvidos e em desenvolvimento tende a se elevar continuamente (DEVIVO, 2012).

O desenvolvimento e sistematização do atendimento pré-hospitalar ao politraumatizado, associados a técnicas operatórias de estabilização interna, diminuíram a mortalidade e a incidência de complicações frequentes como infecção respiratória, trombose venosa profunda e escaras. Esta evolução levou a uma redução de 69% das taxas de mortalidade no primeiro ano após a lesão medular, em comparação com os dados estatísticos da década de setenta (DEVIVO, 2012). Apesar desta evolução, entretanto, o tratamento específico da lesão medular permaneceu uma questão ainda sem resposta.

Com o aumento da incidência do trauma raquimedular associado a uma redução das taxas de mortalidade, há uma tendência de aumento da prevalência de pacientes que terão que conviver com algum grau de incapacidade física devido à lesão medular crônica.

A prática médica atual classifica a lesão neurológica instalada decorrente do trauma raquimedular como irreversível. Fisioterapia e reabilitação são os tratamentos preconizados atualmente com a função de manter o tônus muscular e evitar anquiloses articulares. Na maioria dos serviços de reabilitação, o paciente é treinado para desenvolver um maior grau

de independência e ensinado a conviver de forma resignada com as suas limitações funcionais.

Em observação ao panorama árido que se descortina para o paciente com lesão medular, o objetivo deste estudo é avaliar a possibilidade de uma nova terapia que possa modificar a evolução natural da lesão medular traumática. Pequenos ganhos para o paciente com lesão medular podem significar alterações dramáticas em sua qualidade de vida.

No final do século passado inicia a revolução de uma nova forma de tratamento para patologias ditas intratáveis. Este tipo de tratamento, definido como medicina regenerativa, consiste em utilizar células, fatores de crescimento e diferenciação celulares, biomateriais que possibilitam que o próprio organismo regenere órgãos e tecidos lesionados. Alguns destes tecidos foram por muito tempo considerados como incapazes de regeneração como o Sistema Nervoso Central e tecidos musculares (SANTOS, SOARES & CARVALHO, 2004).

O procedimento padrão da medicina regenerativa é o transplante de células-tronco. Células-tronco são células com característica de se replicar e renovar por longos períodos mantendo um cariótipo normal (BIANCO & ROBEY, 2001). Estas células possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares funcionais, tais como células hepáticas (LEE *et al*, 2004) ou células nervosas (WOODBURRY *et al*, 2002).

Além da capacidade de diferenciação e reposição de tecidos danificados, as células-tronco podem atuar de forma indireta na regeneração de tecidos pela secreção de fatores tróficos, modulação da resposta inflamatória e substrato para o crescimento axonal (PARR *et al*, 2007; BARNABÉ & FRISÉN, 2008).

Com a ineficiência de outras abordagens para o tratamento da lesão medular, como por exemplo a farmacológica, a terapia celular emerge como uma estratégia válida a ser testada para tratamento da lesão medular traumática.

Dentre os diversos tipos celulares que poderiam ser utilizados, definimos pelo uso de células-tronco mesenquimais para a realização deste estudo. Células-tronco mesenquimais são células adultas encontradas no estroma de vários órgãos como medula óssea e tecido adiposo, tem como característica a capacidade de se diferenciar, em meio específico, em células de linhagem condrogênica, adipogênica e osteogênica (PITTINGER, 1999). A facilidade de acesso, a possibilidade de uso autólogo e expansão *in vitro* estável e segura, sugerem que este tipo específico de célula-tronco seja adequado para utilização clínica. De fato as células-tronco mesenquimais são utilizadas com segurança em ensaios clínicos para diversas doenças (HARE *et al*, 2009; LIANG *et al*, 2011; NING *et al*, 2008).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1.OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a exequibilidade e a segurança da infusão microcirúrgica de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMMO) autólogas em pacientes com trauma raquimedular classificação ASIA A, com mais de 6 meses de lesão.

### 2.2.OBJETIVO SECUNDÁRIO

- Avaliar a potencial eficácia do método na recuperação da função motora avaliada através de exame físico sistematizado.

- Avaliar a potencial eficácia do método pelo restabelecimento na sensibilidade através do mapeamento com filamentos de Von Frey e exame clínico sistematizado.

- Avaliar a potencial eficácia do método na função urológica através de estudo urodinâmico.

- Avaliar a potencial eficiência do método em modificar o padrão isoeletrico encontrado no exame de SSEP pré-operatório

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. TRAUMA RAQUIMEDULAR

O trauma raquimedular é definido como uma lesão de qualquer causa externa na coluna vertebral que acomete medula ou raízes nervosas em um dos seus seguimentos. A lesão medular é considerada completa quando não há contração muscular nem sensibilidade abaixo do nível de lesão, sendo definida ao exame físico pela ausência de contração ou sensibilidade do esfíncter anal (ASIA, 2002). O trauma raquimedular é considerado como trauma aberto, quando observa-se solução de continuidade, ou fechado, quando não há solução de continuidade com o meio externo. As causas mais comuns de lesão raquimedular são os acidentes com veículos automotores, as quedas de altura, acidentes em práticas desportivas e traumatismos relacionados a atos de violência (TUONO, 2008; NSCI, 2012).

#### 3.2. EPIDEMIOLOGIA DAS LESÕES RAQUIMEDULARES

A condição de lesão medular, embora seja relativamente rara em termos estatísticos, emerge para o indivíduo como uma situação devastadora, que modifica completamente a sua relação com aspectos práticos da vida pessoal e em sociedade. Por outro lado, uma vez que a incidência da lesão medular traumática ocorre em uma faixa etária descrita como adulto jovem e economicamente ativa, o impacto financeiro para as famílias e para a sociedade deve ser seriamente considerado. Dados canadenses demonstram que a média de gasto direto individual para pacientes portadores de lesão medular completa está em torno de 120.000 dólares anuais, enquanto os pacientes com lesão incompleta teriam um custo de 42.000 dólares ano (MUNSE *et al*, 2013; DRYDE *et al*, 2005). A soma dos custos diretos e indiretos chegam a uma cifra de 3 milhões de dólares para pacientes com lesão cervical completa e 1,5 milhões de dólares para pacientes com paraplegia incompleta. O custo anual para o país com pacientes portadores de lesão medular está em torno de 2,67 bilhões de dólares (KRUEGER *et al*, 2013).

Segundo o banco de dados norte-americano para o trauma raquimedular, a incidência do TRM é de cerca de 40 casos por milhão de habitantes, com a média de 12.000 casos por ano nos Estados Unidos. A faixa etária média dos pacientes acometidos tem aumentado, estando atualmente em 41 anos. A principal causa da lesão medular traumática são os acidentes automobilísticos com 39,2%, seguido de acidentes por queda com 28,3% (NSCI, 2012). A prevalência dos indivíduos que sofreram trauma raquimedular nos Estados Unidos é de aproximadamente 270.000 pessoas, sendo a tetraplegia incompleta o tipo de



lesão mais encontrada (40,8%). Nesta população, o sexo mais acometido foi o masculino (80%) (NSCI, 2012).

Globalmente, a incidência de trauma raquimedular na Europa e Austrália está em 15 pacientes por milhão de habitantes (CRIPPS *et al*, 2011). Esta incidência nos países em desenvolvimento varia de 2,1 pacientes por milhão de habitante na Arabia Saudita a 130,7 pacientes por milhão de habitantes na Bulgária (RHAHIMI-MOVAGHAR *et al*, 2013). A etiologia do trauma raquimedular também apresenta variações em relação aos países estudados. A principal causa de trauma raquimedular nos países desenvolvidos ocidentais está relacionada a acidentes com veículos automotores de quatro rodas; no sudoeste asiático, os acidentes com veículos automotores de duas rodas são os mais frequentes. O sul da Ásia, Japão e Oceania apresentam os acidentes por queda como causa mais frequentes de lesão raquimedular. Na África sub-saariana, as lesões medulares causadas por atos de violência chegam a 38% dos casos relatados; nos Estados Unidos, esta taxa está em 15%, enquanto na Europa as lesões medulares associadas a atos de violência estão em 6% (CRIPPS *et al*, 2011).

No Brasil, não há um banco de dados nacional para os pacientes de trauma raquimedular. Na realidade, não há um centro de gerenciamento nacional que possa gerar dados sobre a incidência e prevalência brasileiras, bem como as particularidades regionais que possam orientar o poder público na criação de políticas específicas para a prevenção ou tratamento da lesão medular. Na literatura nacional, encontram-se apenas séries epidemiológicas restritas de hospitais ou alguns estados (CAMPOS *et al*, 2008; PEREIRA *et al*, 2011; SOUZA JUNIOR *et al*, 2003; DA PAZ *et al*, 1992).

Em 2008, Tuomo descreveu uma análise retrospectiva dos dados do Sistema Único de Saúde (SUS) para internamentos de pacientes diagnosticados com lesão traumática vertebral no período compreendido entre 2000 a 2005. Este estudo demonstrou que 0,2% de todas as internações do SUS foram devido a lesões vertebrais, correspondendo a 2,7% das lesões por causas externas e 3,5% dos internamentos de causas traumáticas. As taxas de internação relatadas neste estudo foram crescentes no período estudado e os estados com maior número de internações proporcionalmente foram o Distrito Federal e o Mato Grosso. Em concordância com a literatura, as internações masculinas superaram as femininas numa proporção de 4:1 e a faixa etária mais frequente foi a compreendida entre 20 e 39 anos. Segundo a autora, a principal causa de lesão vertebral traumática foi acidente com altura (40% dos internamentos), seguida de acidente com veículos automotores (22,7%). O segmento lombar foi o mais acometido (58,5%), seguido do nível cervical (28,5%) e

torácico (7,7%). O comprometimento neurológico foi encontrado em 16% dos casos, sendo o nível cervical o mais acometido (TUOMO, 2008).

A prevalência de pacientes com sequelas neurológicas por lesão medular tende a aumentar nos próximos anos devido à redução das taxas de mortalidade associada ao aumento da incidência (DEVIVO,2012). Na realidade, observar-se-á um contingente cada vez maior de pacientes portadores de lesão neurológica estabelecida sem um desfecho satisfatório, tendo como horizonte atual apenas tratamento fisioterápico e reabilitação.

### 3.3. FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES RAQUIMEDULARES

Diferentes estratégias são utilizadas em busca de um tratamento efetivo para a lesão medular; as dificuldades encontradas se relacionam à multiplicidade de eventos que ocorrem durante e após trauma. Certamente, a compreensão da complexidade da fisiopatologia da lesão medular é necessária para o desenvolvimento de novas estratégias. Este conhecimento é a base para a descoberta de novos alvos terapêuticos e novas técnicas de tratamento.

A lesão raquimedular compromete simultaneamente as meninges, os vasos sanguíneos e o tecido nervoso. Na maioria dos casos, a dura-máter e a aracnoide permanecem intactas, assim como as artérias espinhais anterior e posterior. A transferência de energia cinética para a medula espinhal, o rompimento dos axônios, a lesão das células nervosas e a ruptura dos vasos sanguíneos causam a lesão primária da medula espinhal. Esta lesão primária pode ser classificada histopatologicamente em:

- Lesões sólidas – a aparência da medula parece normal, sem alterações evidentes, sem cavitações ou mudanças de coloração embora o dano medular pode ser observado no exame histopatológico(figura 1 B);
- Contusão e cavitação – lesões mais frequentes, sem alteração na superfície medular nem aderências em dura-máter, porém sendo observadas áreas de hemorragia e necrose no parênquima medular, evoluindo para mielomalácia e cavitação cística(Figura 1 C);
- Laceração – observada a perda da anatomia de superfície da medula espinhal, normalmente causada por fragmentos ósseos ou lesões penetrantes, caracterizada pela perda dos limites gliais com danos ao parênquima subjacente e adesões à meninge; o epicentro mostra mínima ou nenhuma cavitação, é observada deposição de tecido conjuntivo e colágeno(figura 1 D);
- Laceração maciça – tecido medular macerado em diversos graus, podendo estar associado a fraturas complexas de corpo vertebral. No epicentro da lesão, observa-se

cicatriz de tecido conectivo e fragmentos de raiz espinhal e extensa cicatriz fibrótica ocorre no decorrer do tempo(figura 1 E) (BUNGE *et al*, 1993).

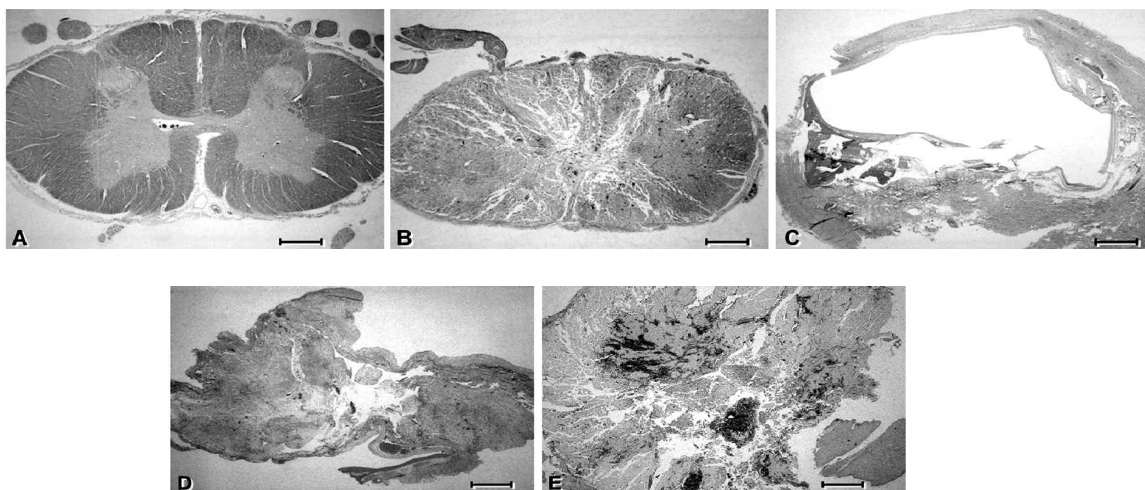


Figura 1: A) Secção de medula normal(LFB-PAS); B) Lesão sólida com perda da citoarquitetura(LFB-PAS); C) Contusão/cavitação com a medula sendo substituída por cisto(H&E); D) Laceração em que a superfície pial mostra-se violada(H&E); E) Laceração maciça, demonstrando fragmentação, distorção e hemorragia(H&E) (NOREMBERG *et al*, 2004).

As alterações e modificações que ocorrem na medula espinhal após o trauma também podem ser classificadas em relação aos eventos cronológicos como imediato, agudo, intermediário e crônico(NOREMBERG *et al*, 2004). A fase imediata ocorre em uma a duas horas de lesão, caracteriza-se pela lesão primária ao tecido medular e consiste no rompimento mecânico da anatomia do tecido. Alterações vasculares são encontradas como vasodilatação, hiperemia e hemorragias. Células produtoras de TNF- $\alpha$  são observadas após 15 minutos de lesão ao redor da área contusa e altos níveis de TNF- $\alpha$  estão relacionados à morte neuronal por aumento da concentração de glutamato. Alterações patológicas são discretas em comparação aos próximos estágios, sugerindo que a perda neuronal está associada aos eventos subsequentes do trauma.

A fase aguda de lesão ocorre em um período entre horas a dois dias após a lesão. Caracteriza-se por um aumento das alterações vasculares, edema, hemorragia e inflamação. Alterações mielínicas e neuronais ocorrem nesta fase. Alterações vasculares, como pequenas hemorragias, são mais comuns na substância cinzenta e ocorrem devido a uma rotura de vênulas ou arteríolas devido ao trauma mecânico ou por uma coagulação intravascular levando a estase venosa que gera edema vasogênico (TATOR & KOYANAGI, 1998). O

processo de edema é ampliado pela quebra da barreira hemato-encefálica, levando ao acúmulo de plasma no compartimento extracelular associado ao aumento da permeabilidade capilar com consequente infiltração de macrófagos ativados que amplificam a resposta inflamatória, aumentando a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-6. A secreção de IL-6 aumenta a migração de macrófagos para o sítio de lesão, levando a uma ativação da micróglia e reduzindo o crescimento axonal loco-regional. O aumento dos níveis de glutamato, a liberação de espécies reativas de oxigênio, o aumento do potássio extracelular, dos níveis de ácido nítrico e amônia, contribuem para o aparecimento do edema citotóxico, que ocorre entre três horas a três dias.

A liberação de radicais livres e citocinas de mediação inflamatória realizados por neutrófilos faz parte da estratégia de defesa orgânica contra espécies invasoras, embora sua real utilidade seja restrita em lesões traumáticas ou isquêmicas. Os neurônios são extremamente sensíveis às moléculas liberadas durante lesão medular. Existe uma correlação entre os níveis de glutamato e TNF- $\alpha$  e a extensão da morte neuronal. O aspecto histopatológico sugere que estas células entram em necrose. Observa-se uma imagem de balonamento do axônio possivelmente devido à obstrução do fluxo axonoplasmático. Estas características são observadas após 24 horas de lesão em preparações coradas por prata, ou por imunohistoquímica como demonstrado na figura 2 (NOREMBERG *et al*, 2004).

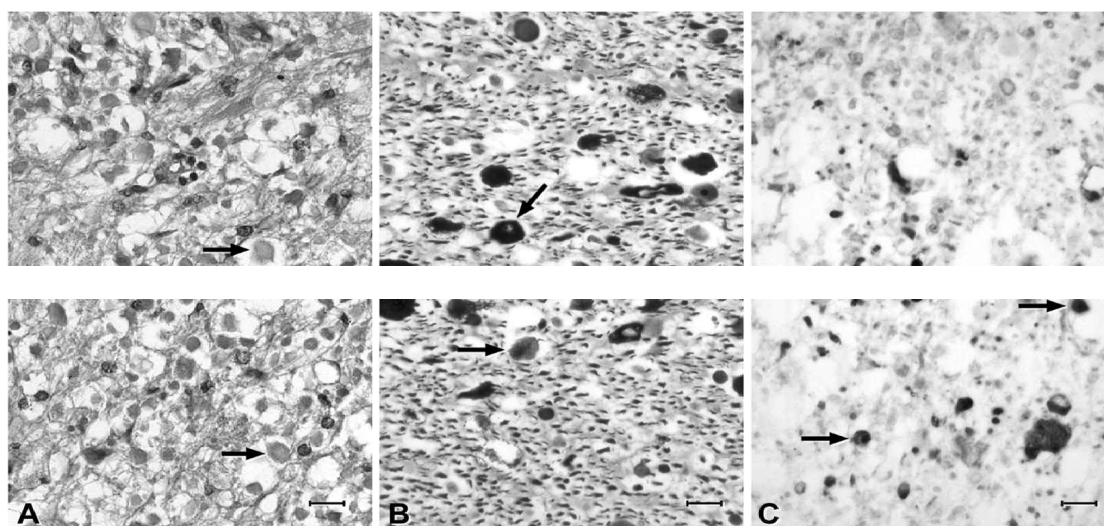


Figura 2: A) Lesão medular imagem de inchaço axonal, (H&E); B) alteração de inchaço axonal melhor visualizado em preparação corada por prata; C) ou visualizado por imunohistoquímica corada para proteína precursora  $\beta$ -amilóide (NOREMBERG *et al* 2004).

Após o trauma, ocorre um rompimento das bainhas de mielina, inicialmente descrito como um edema seguido de fragmentação e posterior fagocitose por macrófagos. Observa-se a presença de células T reativas à proteína mielínica básica: os níveis de contagem destas células podem chegar próximos aos encontrados na esclerose múltipla, levando a uma exacerbação do processo inflamatório e ampliando a área de desmielinização. Assim como os neurônios, os oligodendrócitos são sensíveis ao microambiente inflamatório evoluindo com morte celular por necrose (ZHANG *et al*, 2012).

Durante a fase intermediária, que dura entre dias a semanas, observa-se uma redução do processo inflamatório agudo com eliminação de tecido necrótico, resolução do edema, início da revascularização do tecido e reconstituição da barreira hemato-encefálica.

As células microgliais são ativadas inicialmente nas primeiras horas do trauma, nesta fase estas são as células de maior efetividade: atuam na remoção de tecido necrótico e na manutenção da atividade imunológica e anti-inflamatória. Existem controvérsias sobre o papel deletério das células microgliais no trama raquimedular devido à secreção de citocinas, óxido nítrico, glutamato e proteases que amplificam o dano tecidual secundário. Algumas citocinas liberadas pela micróglia podem ter efeito benéfico, como a IL-1 $\beta$ , que aumenta a produção do fator de crescimento neural (NGF), e a IL-6, que retarda a perda neuronal após axotomia e tem efeito protetor na excitotoxicidade induzida pelo glutamato (HAUSSMAN, 2003; DAVID & KRONER, 2012).

Os macrófagos têm a sua função protetora ao remover o tecido necrótico da área de lesão. São observadas duas subpopulações de macrófagos com fenótipos diferentes: o fenótipo M1 com função citotóxica, secretando TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e o fenótipo M2, que apresenta características de célula reparadora. Os macrófagos M1 podem se modular em M2 após fagocitose (figura 3). Estas células expressam níveis elevados de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  e modulam a ativação do NF- $\kappa$ B e a regulação positiva da arginase 1 (DAVID & KRONER, 2012). A capacidade regeneradora destas células foi utilizada em um protocolo para tratamento de lesão medular com o implante de macrófagos ativados para fenótipo M2 (KNOLLER *et al*, 2005). O baixo número de células M2 após o trauma medular provavelmente contribui para a manutenção do processo inflamatório. Os subtipos M1 e M2 podem retornar ao fenótipo de macrófago não polarizado ou M0 este, por sua vez, pode ter um comportamento citotóxico devido à excreção de moléculas de ferro tóxico da degradação da heme (DAVID & KRONER, 2012).

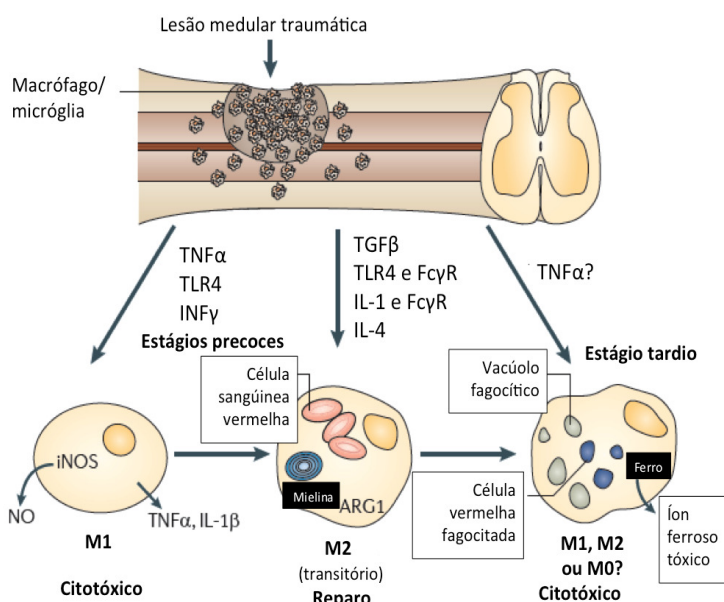


Figura 3: Polarização M1 M2 durante a lesão medular – Imediatamente após a lesão medular, macrófagos adquirem características M1. Um pequeno número destes macrófagos, provavelmente os que fagocitaram material celular, irão apresentar características M2 na fase de reparo. Na fase final observamos uma maior quantidade de macrófagos M1 e uma pequena quantidade de macrófagos M2, podendo até encontrar macrófagos em seu estado primitivo M0, estes macrófagos ainda podem ter comportamento citotóxico devido à liberação de íon ferroso tóxico retirado da hemoglobina de hemácias fagocitadas (DAVID & KRONER, 2012).

Alguns dias após a lesão, os astrócitos tornam-se hipertrofiados e se apresentam com citoplasma abundante e um núcleo grande e pálido; a visão ultraestrutural demonstra células com atividade metabólica intensa. A porcentagem de astrócitos reativos chega ao seu máximo três semanas após o trauma: estas células evoluem com processos citoplasmáticos cada vez mais longos e espessos que irão resultar na assim chamada cicatriz glial, que tem a finalidade de isolar a área de lesão do tecido íntegro. Estes prolongamentos são melhor ilustrados após as células serem coradas por imunohistoquímica para GFAP, como observamos na figura 4 (NOREMBERG *et al*, 2004).

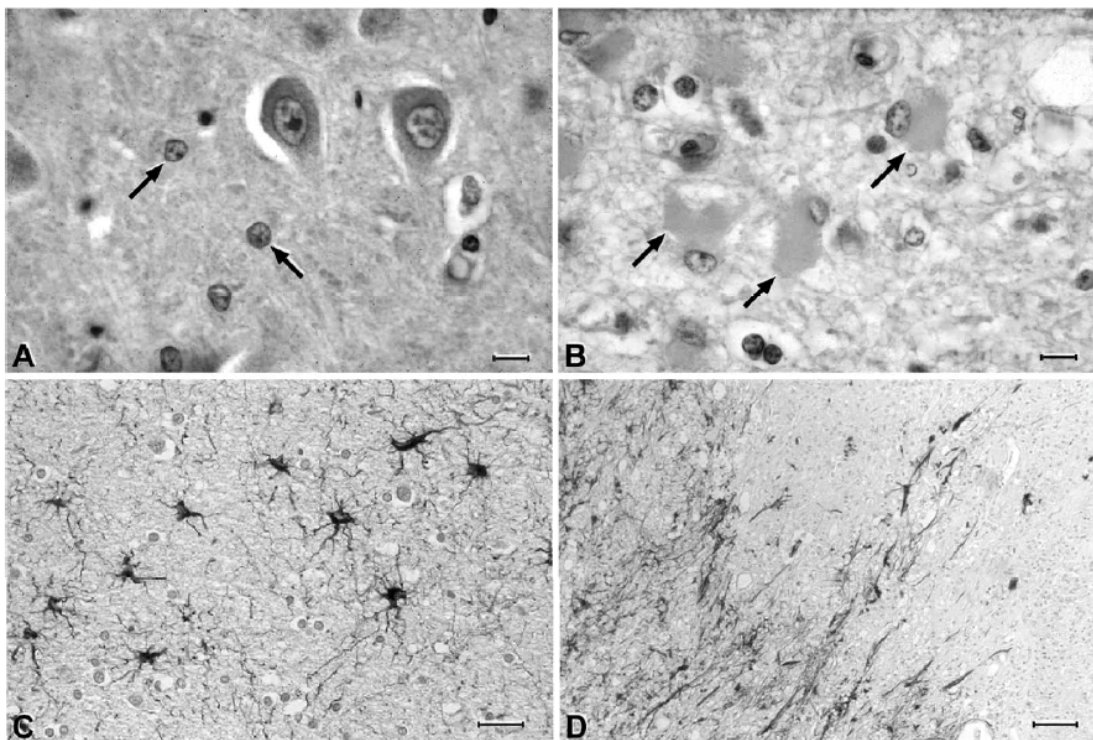


Figura 4: A) Astrócitos normais(setas); B) astrócitos reativos evidenciando citoplasma evidente e núcleo pálido(setas); C) Corados para o GFAP demonstrando os prolongamentos citoplasmáticos; D) Células coradas para o GFAP em área gliótica próximas a região de necrose (NOREMBERG *et al*, 2004).

Apesar de manter o processo inflamatório contido, a cicatriz glial pode se tornar o principal obstáculo para a regeneração axonal. Além da barreira mecânica, os astrócitos reativos secretam moléculas inibitórias da regeneração axonal, como sulfato de condroitina, encontrada na matriz extracelular associada a outras moléculas – como laminina e fibronectina – e moléculas de adesão como N-caderina, ICAM-1 (LEAL-FILHO, 2011). Estudos experimentais demonstraram que o sulfato de condroitina tem a capacidade de encapsular neurônios sensitivos transplantados bem como de evitar a migração destes neurônios para a substância branca hospedeira na ausência de barreira física (DAVIES & SILVER, 1998).

Os astrócitos também secretam fatores de crescimento, tais como PDGF, IGF e BFGF. O caráter ambíguo da função astrocitária na lesão medular pode ser definido topograficamente: astrócitos próximos à área de lesão tem um comportamento reparador; astrócitos mais periféricos seriam os responsáveis pela formação da cicatriz glial. A sinalização por STAT3 também seria efetiva nessa modulação (NOREMBERG *et al* 2004; LEAL-FILHO, 2011).

A fase tardia, que dura entre meses a anos, é caracterizada pela degeneração walleriana, desenvolvimento de cistos e siringes, cicatriz glial e mesenquimal e a “schwanosis”. A degeneração walleriana representa a desintegração anterógrada das bainhas de mielina e axônios transeccionados na lesão medular, sendo caracterizada por bainhas de mielina distorcidas e fragmentadas, com axoplasma denso, floculado ou ausente. O potencial clínico da degeneração walleriana é ainda incerto, embora astrócitos reativos tenham potencial de inibição do crescimento axonal (NOREMBERG *et al*, 2004). Estudos experimentais demonstraram um maior potencial de crescimento de neurônios cultivados em áreas de degeneração walleriana (KLEITMAN & GOMEZ, 1993). A medula espinhal pode ser substituída por tecido conjuntivo rico em colágeno, particularmente após lesões lacerantes: a quebra do limitante glial tende a estimular a criação desta cicatriz rica em colágeno, que obviamente representa uma barreira mecânica para a regeneração axonal (LEAL-FILHO, 2011).

Outro achado na fase tardia é a formação de cistos que podem ser únicos, múltiplos ou multiloculados. São recobertos por uma fina parede de tecido astroglótico sendo preenchidos por fluido extracelular, onde são comumente encontrados macrófagos, tecido conectivo e vasos sanguíneos. Estes cistos representam a fase final do processo necrótico medular.

A siringe também é um tipo de cavitação que se difere da anterior por ter uma parede gliótica mais densa e por ter relações com o canal central da medula. Por ser uma cavidade que está sob pressão, a presença de siringe pode levar a um grau de desmielinização de tecido saudável ou até evoluir para níveis medulares mais altos caso não seja tratada com derivação (NOREMBERG *et al*, 1998).

“Schwanosis” é um termo que define a proliferação aberrante intra ou extramedular de células de Schwann e axônios – de forma análoga, mas não semelhante, se correlaciona aos neuromas de amputação dos nervos periféricos. Porções variáveis da medula podem ser substituídas por “schwanosis”, normalmente associados a lesões penetrantes, nas quais células da raiz nervosa penetram na medula. Estudos de séries relatam que este processo pode ser encontrado em até 50% dos casos (estudados em necropsia). Apesar do seu papel na lesão medular ser incerto, a presença de axônios aberrantes tende a contribuir para respostas neurofisiológicas desorganizadas que podem gerar dor neuropática e espasticidade, complicações comuns e graves no lesado medular crônico (NOREMBERG *et al*, 1998).



### 3.4. TRATAMENTOS

Ao longo da história da humanidade, o tratamento da lesão medular associada ao trauma raquimedular tem se modificado, embora ainda hoje se mantenha como um desafio para a prática médica. De acordo com relatos do antigo Egito, a lesão medular chegou a ser encarada como uma doença que não deveria ser tratada (HUGHES, 1988). Posteriormente, durante toda a antiguidade, o tratamento para as fraturas espinhais se baseava nos preceitos de Hipócrates e Galeno (MARKETOS & SKIADAS, 1999). Após o Renascimento, com a mudança de paradigmas advinda dos trabalhos de Vesalius sobre a anatomia humana, novas bases para o tratamento das fraturas vertebrais foram propostas, principalmente quanto à possibilidade de tratamento cirúrgico (KNOELLER & SEIFRIED, 2000). Entretanto, as taxas de infecção e mortalidade observadas após o tratamento cirúrgico eram extremamente elevadas, o que tornou este tipo de terapia pouco popular. Após a publicação do trabalho sobre assepsia de Leister no século XIX (LEISTER, 1867) e a evolução da anestesia ocorrida no mesmo período (KNOELLER & SEIFRIED, 2000), a possibilidade de um tratamento efetivo para a lesão medular passou a ser novamente aventada.

No início do século passado, os primeiros trabalhos experimentais realizados aumentaram a compreensão da fisiopatologia da lesão medular; inclusive, com alguns destes protocolos de pesquisa sendo utilizados até os nossos dias (YEO, 1975; SCHLESINGER, 1991). Após a segunda guerra, observou-se avanço importante no tratamento da lesão medular, a qual foi inicialmente classificada (HOLDSWORTH & HARDY, 1953) e, a partir daí, novas modalidades de tratamento foram criadas (FREEMAN & WRIGHT, 1953; ROBINSON & SMITH, 1955). Por exemplo, a possibilidade do uso de próteses metálicas que cada vez mais proporcionassem uma mobilização precoce do paciente no pós-operatório, evitando complicações e reduzindo o tempo de internamento (HARRINGTON, 1967).

A filosofia preconizada para o tratamento do traumatismo raquimedular da década de 50 até o presente momento se baseia na descompressão medular, no alinhamento sagital e na estabilização vertebral (STAHEL *et al*, 2012). A descompressão medular permite uma melhora no fluxo sanguíneo vertebral, além de retirar a compressão mecânica sobre o tecido nervoso, reduzindo a cascata de eventos que levam aos danos secundários (GUGA *et al*, 1987; TATOR & KOYANAGI, 1997). A estabilização vertebral é fundamental para realizar uma rápida mobilização do paciente no pós-operatório, evitando complicações comuns do paciente com lesão medular como trombose venosa, infecções do trato

respiratório e escaras de decúbito (STAHLE *et al*, 2012). A discussão existente em relação ao tratamento cirúrgico é basicamente relacionada ao tempo de intervenção. Estudos prévios não demonstraram vantagens na realização de procedimento de descompressão de forma precoce em relação a descompressão em fase tardia (VACCARO *et al*, 1997). Atualmente, entretanto, após estudos prospectivos com um maior número de pacientes, demonstrou-se estatisticamente vantagens da descompressão cirúrgica precoce (FEHLINGS *et al*, 2012; LI *et al*, 2014).

A metilprednisolona, um potente corticosteróide com seu mecanismo de ação baseado no metabolismo da peroxidação lipídica, foi o primeiro agente farmacológico a ser utilizado para tratamento da lesão medular traumática (DUCKER & HAMIT, 1969). O resultado positivo com o uso de metilprednisolona em estudos experimentais levou a realização de estudo clínico multicêntrico, duplo cego, que definiu este tratamento como estatisticamente relevante (BRACKEN, 1984; 1993; 1998). A pulsoterapia com metilprednisolona na fase aguda do trauma raquimedular foi uma diretriz aceita internacionalmente durante a década de 90. Por outro lado, novos estudos estatísticos não corroboraram sua eficácia, sendo salientados os efeitos colaterais e as complicações deste protocolo. Conseqüentemente, sua indicação atualmente se encontra descontinuada para tratamento da lesão medular aguda (HUBERT, 2000). Um estudo experimental, contudo, demonstrou recentemente uma maior eficácia da metilprednisolona em uso local associada a nanopartículas (CHVATAL *et al*, 2008).

Outras terapias farmacológicas foram testadas para tratamento da lesão medular traumática nas três últimas décadas: estudos experimentais com antagonistas opióides como a naloxana (YOUNG *et al*, 1981; BLACK, 1986) e bloqueadores de canal de cálcio como a nimodipina (IMAMURA & TATOR, 1998). Os resultados destes estudos, entretanto, não demonstraram a eficácia dos agentes farmacológicos testados.

Em 2001, foi publicado estudo prospectivo de centro único com o uso de gangliosídeos, esfingolipídios que atuam como receptores de membrana, para tratamento de lesão medular aguda em 28 pacientes. O resultado estatístico não demonstrou eficácia do método, embora os pesquisadores observaram melhora clínica nos pacientes com lesões de menor gravidade (GEISLER *et al*, 2001). Outro estudo prospectivo fase 2 utilizou um antagonista do NMDA, gacyclidina para tratamento de pacientes com lesão raquimedular em até duas horas após o trauma. Foram tratados 250 pacientes durante a fase aguda, com 67 pacientes no grupo controle em uso de placebo. Não houve diferenças estatísticas que propusessem o uso do medicamento em larga escala (TADIE *et al*, 2003).

Na presente década, temos três agentes farmacológicos sendo testados para tratamento da lesão raquimedular. A minociclina, antibiótico da classe das tetraciclina com efeitos *in vitro* e *in vivo* comprovados em reduzir a apoptose neuronal e de oligodendrócitos, diminuir a ativação da micróglia e reduzir a inflamação no SNC, foi objeto de estudo clínico que não demonstrou sua eficácia do ponto de vista estatístico (CASHA *et al*,2012). A glibenclamida, medicação para tratamento de diabetes que atua bloqueando receptor Sur1 e reduzindo o influxo de cálcio para dentro da célula através do bloqueio dos canais de sódio, diminuindo a necrose hemorrágica pós-traumática. O riluzole, medicação para tratamento de esclerose lateral amiotrófica, tem como função o bloqueio de correntes de sódio. Comparado o resultado dos dois últimos medicamentos em estudo experimental, observou-se melhor resultado no grupo tratado com a glibenclamida (SIMARD *et al*, 2012).

Terapias não farmacológicas também foram utilizadas para tratamento da lesão medular traumática. A hipotermia, que chegou a ser estudada como agente neuroprotetor na década de 50, teve uma tendência de retorno como opção válida para tratamento da lesão medular traumática na última década principalmente com a hipotermia sistêmica moderada sendo empregada. Estudos clínicos isolados demonstram a efetividade da técnica, mas é necessário um estudo multicêntrico para definir estatisticamente a eficácia da hipotermia para tratamento da lesão medular aguda (AHAMAD, 2013; WANG *et al*, 2013).

A aplicação de um campo magnético implantado próximo a medula espinhal lesada foi utilizada para tratamento de lesão medular em um estudo clínico fase 1. Apesar dos resultados iniciais descritos demonstrarem eficácia, não foram realizados outros estudos posteriores (SHAPIRO *et al*, 2005; 2014).

Outra possibilidade surgida recentemente consiste em estratégias baseadas em neuroestimulação e neuromodulação, que são utilizadas com a finalidade de propiciar um retorno da função motora em pacientes com lesões medulares, utilizando eletrodos epidurais (HARKEMA *et al*, 2011) ou microestimulação intramedular (BAMFORD & MUSHAHWAR, 2011).

### 3.5.TERAPIA CELULAR

Uma das limitações da prática médica convencional reside na incapacidade de reconstituir tecidos lesionados. Existe hoje uma variedade de doenças nas quais o tratamento disponível não é efetivo. Sob esta perspectiva, os procedimentos baseados em terapia celular, dentre eles o transplante de células-tronco, surgem como um novo campo de

atividade médica, a denominada medicina regenerativa.

Ascélulas-tronco foram inicialmente observadas em experimento que avaliava a sensibilidade à radiação de células de medula óssea de camundongos. Após uma dose de radiação supraletal, foi realizado o transplante de células de medula óssea. Na necropsia, verificou-se a presença no baço de formação de colônias derivadas de uma única célula (TILL & MACCULOGH, 1961). Estas células se caracterizam pela capacidade de se replicar e se renovar por longos períodos, mantendo seu cariótipo preservado (BIANCO & ROBEY, 2001). As células-tronco possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares funcionais, tais como células hepáticas (LEE *et al*, 2004) ou células nervosas (WOODBURRY *et al*, 2002).

As células-tronco podem ser definidas como: a) totipotentes, as quais podem se diferenciar em tecidos embrionários e extra-embrionários; b) pluripotentes, que se diferenciam em células dos três folhetos germinativos; c) multipotentes, que têm a capacidade de se diferenciar em um subconjunto de linhagens celulares; d) oligopotentes, com a capacidade de formar tecidos de um único folheto embrionário; e e) onipotentes, que podem se diferenciar em apenas um tipo celular (WAGERS & WEISSMAN, 2004).

Pode-se classificar as células-tronco, de acordo com seu estado específico de ontogênese, como: embrionárias, fetais e adultas.

As denominadas células-tronco embrionárias são retiradas do embrião na fase de blastocisto. Em cultura, estas células mantiveram o cariótipo normal mesmo após oito meses de cultivo (32 passagens). Expressavam altos níveis de atividade de telomerase, lembrando que a atividade da telomerase se relaciona à imortalidade nas linhagens celulares humanas (THONSOM *et al*, 1998). As células-tronco embrionárias possuem a capacidade de se multiplicar indefinidamente *in vitro*, sem alteração na sua carga genética (DONOVAN & GEAHART, 2001). Linhagens celulares derivadas de células-tronco embrionárias mantêm sua capacidade, em meios específicos, de formar tecidos dos três folhetos germinativos (THONSOM *et al*, 1998). Conceitos éticos e religiosos, todavia, reduzem a sua utilização de forma ampla.

As células-tronco fetais, por sua vez, são isoladas a partir de fetopropriamente ou das estruturas de suporte extraembrionárias que são de origem fetal como cordão umbilical e placenta. O seu potencial de diferenciação recapitula características de plasticidade que transitam entre as células-tronco embrionárias pluripotentes e as células-tronco adultas multipotentes (PAPPA & ANAGNOU, 2009),

As células-tronco adultas são encontradas no organismo já constituído, possuem

uma capacidade de diferenciação menor que as células embrionárias e são encontradas em praticamente todos os órgãos e tecidos como medula óssea, tecido adiposo, sistema nervoso central. Estas células participam da produção de células especializadas nos processos de crescimento, diferenciação e renovação teciduais e celulares, reduzindo o envelhecimento precoce de tecidos. Tal processo foi definido como Programa de Desenvolvimento (CAPLAN, 2007). As células-tronco adultas mais estudadas são as encontradas na medula óssea: as células-tronco hematogênicas e as mesenquimais (BIANCO & ROBEY 2001). Devido à presença de células-tronco adultas em praticamente todos os órgãos, sua capacidade de replicação e a possibilidade de serem coletadas do próprio paciente, evitando problemas imunológicos através da utilização de autoenxerto, as células-tronco adultas são candidatas naturais para a realização de terapia celular (CAPLAN, 2007).

### 3.6.CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco adultas mesenquimais são células responsáveis pela renovação das células estromais da medula óssea e se caracterizam por se diferenciar em células de linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica (PITTINGER *et al*, 1999). Foram primeiramente descritas em 1970 quando Friedenstein notou a presença de células semelhantes a fibroblastos em culturas de baço e medula óssea. Estas células chamadas de estromais tinham a capacidade de formar colônias de clones *in vitro* derivadas de uma única célula, quando inoculadas em câmaras de difusão, exibiam potencial osteogênico. O autor definiu a possibilidade de um tipo de célula-tronco adulta encontrada no tecido hematopoiético que não se diferenciava em células de linhagem hematogênica (FRIEDENSTEIN *et al*, 1970).

Em cultura, células mesenquimais possuem formato semelhante a um fibroblasto. Este subtipo celular tem a capacidade de aderir a superfície plástica, o que as diferem das células hematopoiéticas. Quanto à caracterização fenotípica, estas células devem expressar marcadores de superfície como CD73, CD90 e CD105 e não devem expressar os marcadores tipicamente encontrados em linhagem hematopoiéticas como c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19 e CD79 (DOMINICI *et al*, 2006). Aliás, os critérios que definem a célula-tronco mesenquimal são: a capacidade de aderir ao plástico, o potencial de diferenciação e a expressão de antígenos de superfície específicos (DOMINICI *et al*, 2006).

Além de substituir as células estromais de medula óssea, as células-tronco mesenquimais atuam em sinergia com o tecido hematopoiético, tendo um papel importante na modulação da hematopoese (CAPLAN *et al*, 2006). Além da medula óssea, as células-

tronco mesenquimais são encontradas em praticamente todos os órgãos, como pulmões, cordão umbilical, tendões e membrana sinovial (MEIRELLES *et al*, 2006).

A capacidade de células mesenquimais de se diferenciar em células de linhagem neurogênica foi descrita previamente (WOODBURY *et al*, 2000). Entretanto, outros estudos demonstram que estas células, apesar de se apresentarem positivas aos marcadores neuronais, não têm capacidades funcionais em sua maioria (LU *et al*, 2004), sendo possível que a sua morfologia seja um artefato de cultura (AZARI *et al*, 2010). Estudos experimentais questionam o potencial de diferenciação das células mesenquimais em células de linhagem neuronal (PARR *et al*, 2008).

Descreve-se na literatura que, possivelmente, o principal mecanismo efetor das células mesenquimais na regeneração de tecidos lesionados, seria a secreção de fatores tróficos e regenerativos – e não pela reposição celular (CAPLAN, 2007; PARR *et al*, 2007; SASAKI *et al*, 2009). Funcionalmente, estes fatores suprimem a resposta imune local, inibem a fibrose e apoptose, aumentam a angiogênese e estimulam a mitose e a diferenciação de células residentes em células reparadoras.

Os principais fatores tróficos liberados por CMMO quando transplantadas no microambiente do SNC são as neurotrofinas, polipeptídeos que possuem um papel crítico no desenvolvimento neuronal e que aparentemente medeiam uma resposta protetora celular em um organismo adulto. Tanto o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) quanto o fator neurotrófico neural (NGF) têm a sua secreção aumentada quando as células mesenquimais são expostas ao microambiente do SNC. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é uma citocina relacionada à angiogênese e vasculogênese e está relacionado à redução da área de infarto e apoptose em modelos de isquemia cerebral; exibe, ainda, um efeito neuroprotetor direto independente da angiogênese. Apesar do nome, o fator de crescimento hepático (HGF) tem como alvo uma extensa série de células e tecidos pela promoção de atividades mitogênicas e morfogênicas; a administração de HGF exógeno aumenta a velocidade de reparo em tecidos submetidos a isquemia ou trauma agudo. Em culturas de células mesenquimais com extrato de encéfalo submetido à isquemia em comparação com culturas de mesenquimais associadas a extrato de encéfalo normal, verifica-se que a concentração de HGF praticamente dobra em culturas com tecido isquêmico (CHEN *et al*, 2002).

As CMMO secretam fibronectina, uma glicoproteína de alto peso molecular. Estudos demonstram a capacidade da estruturas de fibronectina de integrar-se em áreas de lesão medular espinhal e atuar como suporte para o crescimento axonal (KING *et al*, 2006).

Alguns efeitos terapêuticos das células-tronco mesenquimais são obtidos de forma indireta pela modulação das células que compõe a orquestra inflamatória. Macrófagos em associação com células mesenquimais são modulados reduzindo a secreção de TNF- $\alpha$  e migração, linfócitos são modulados para aumentar a produção de IL-4 e IL-10, reduzindo a secreção de IFN- $\gamma$  e anticorpos (AZARI *et al*, 2010). Observou-se a capacidade das CMMO de induzir a repressão da apoptose mediada pela caspase-3 em neurônios e oligodendrócitos em um modelo de lesão medular, com fatores secretados que estimulam as vias de sinalização endógenas de sobrevivência, como PI3K/AKT e MAPK/ERK1/2 (DASARI *et al* 2007; ISELE *et al*, 2007).

Os possíveis mecanismos de ação citados e a segurança da expansão e caracterização *in vitro* tornam este subtipo celular adequado para a realização de estudos experimentais e clínicos.

### 3.7.TERAPIA CELULAR E LESÃO RAQUIMEDULAR

Devido ao seu caráter altamente incapacitante e à limitada eficácia do tratamento atual, as patologias do SNC são um alvo natural para experimentos em terapia celular. O primeiro resultado objetivo de tratamento de lesão medular espinhal por terapia celular foi observado no experimento realizado por Ramón-Cuerto, por meio de secção medular seguida de introdução de canais de orientação entre os cotos preenchidos por células gliais derivadas de bainha olfatória. Nele, observou-se regeneração axonal na interface medula-enxerto, demonstrando a viabilidade da reconstrução da via de informação neural (RAMÓN-CUETO *et al*, 1998). Outros estudos corroboraram para a viabilidade de células-tronco no SNC após transplante (KOPEN *et al*, 1999; BRAZELTON *et al*, 2000; CHOPP *et al*, 2001; PEARSE *et al*, 2007).

A efetividade do procedimento de terapia celular para tratamento da lesão raquimedular foi comprovada em inúmeros estudos pré-clínicos em que se verificou melhoras em testes funcionais, principalmente no teste de marcha como o BBB. Estes estudos utilizaram células-tronco embrionárias (MCDONALD *et al*, 1999; KEIRSTEAD *et al*, 2005; SHARP J *et al*, 2010), CMMO (HOFSTETER *et al*, 2002; OHTA *et al*, 2004; LEE *et al*, 2007; BOIDO *et al*, 2014), células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (KANG *et al*, 2007; RYU *et al*, 2009; ZANGH *et al*, 2009) e células mesenquimais derivadas de cordão umbilical (YANG *et al*, 2008; HU SL *et al*, 2010).

Demonstrou-se, ainda, a capacidade de remielinização após transplante celular de tecido medular desmielinizado por lesão química e/ ou radioativa após transplante celular

de células mononucleares de medula óssea, células mesenquimais e células tronco neurais (AKYAMA *et al*, 2002a; AKYAMA *et al*, 2002b; MOTHE & TATOR, 2008). Além disso, foi observada a redução de cavitações medulares em espécimes submetidos a lesão experimental em comparação com grupo controle após tratamento com terapia celular, descreveu-se na avaliação anatomopatológica a presença de tecido neoformado preenchendo as cavitações medulares composto de axônios e CMMO expressando marcadores gliais e neuronais (ZURITA *et al*, 2008; OHTA *et al*, 2004). A presença de deposição de fibronectina na interface entre o enxerto e tecido medular e ao redor das estruturas vasculares também foi relatada (ZENG *et al*, 2011).

Uma das principais discussões sobre a terapia celular em lesões medulares é a sua eficácia em tratar lesões medulares em fase crônica. Recordando a fisiopatologia, os astrócitos reativos formam uma rede citoplasmática que atua isolando a reação inflamatória, mas também funcionam como uma barreira mecânica a regeneração axonal. Lu descreveu experimento em que foi realizado transplante de CMMO em cobaias durante a fase crônica de lesão medular e observou axônios penetrando o sítio de lesão através da cicatriz glial estabelecida (LU *et al*, 2007). Em outro experimento, realizou-se o transplante de células tronco neurais em espécimes submetidos a lesão medular aguda, subaguda e crônica, avaliando como o microambiente modularia as células transplantadas. Para tanto, fez-se a separação das células por citometria de fluxo e seus transcriptomas foram comparados por sequenciamento de RNA, demonstrando uma produção de moléculas regenerativas e neurotróficas mais proeminente nas cobaias transplantadas na fase crônica (KUMAMARU *et al*, 2013). Zurita descreveu experimento em que foi realizado transplante de CMMO em animais submetidos à lesão experimental, apresentando paraplegia por três meses prévios ao transplante. Poucas semanas após o procedimento, o autor observou retorno da função motora nos animais tratados e o grupo controle manteve quadro de paraplegia. Após um ano pós-transplante, os resultados na escala BBB aplicada aos animais tratados estavam próximos ao limite superior (ZURITA & VAQUERO, 2006).

Em relação a efetividade da terapia celular em lesão medular de mamíferos maiores, observamos a descrição do resultado de transplante de CMMO em felino com história de lesão medular crônica e completa. A avaliação clínica pós-operatória evidenciou retorno do reflexo panicular e sensibilidade a dor sete dias após o procedimento, o primeiro passo foi dado com 75 dias após o transplante e foi descrito reestabelecimento parcial das função vesical e intestinal do animal tratado (PENHA *et al*, 2012). Em estudo realizado com porcos



com lesão medular crônica submetidos a transplante de CMMO, foi observado a melhora clínica nos animais tratados, observou-se também alteração de latência e amplitude no SSEP pós transplante em comparação com o exame prévio ao procedimento. A análise histopatológica descreveu cavitações medulares preenchidas de tecido nervoso neoformado, demonstrado remielinização por CMMO em área de lesão medular desmielinizada (ZURITA *et al*, 2008). Em estudo com cães de companhia apresentando lesão medular crônica por patologia discal, Penha descreve resultados motores obtidos em 3 dos 4 animais submetidos a transplante de CMMO, dois espécimes demonstraram melhora de sensibilidade dolorosa iniciada no décimo dia após transplante, observado melhora parcial das funções vesical e intestinal nos espécimes que apresentaram melhora sensitiva, o tempo de seguimento do estudo foi de 18 meses (PENHA *et al*, 2014).

Não foi relatado, nos estudos experimentais revisados, a presença de tecido com características neoplásicas no sítio de transplante. Da mesma forma, não houve relato de complicações referentes ao procedimento de terapia celular. A figura 5 sumariza os potenciais mecanismos de ação das células-tronco na regeneração da medula espinhal.

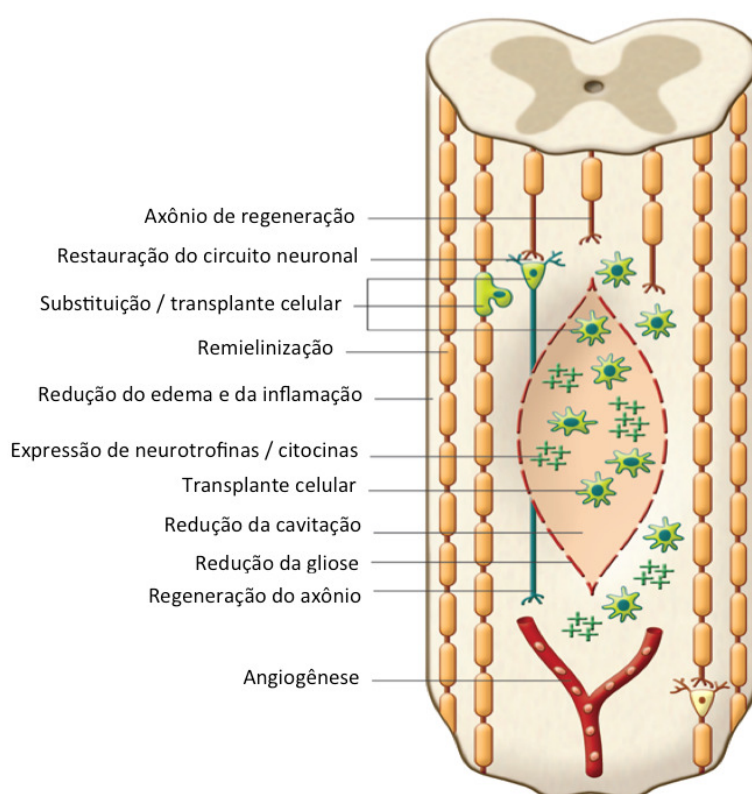


Figura 5: Potenciais mecanismos de reparação da medula espinhal após transplante com células-tronco(MOTHE &TATOR, 2008).

### 3.8. ESTUDOS CLÍNICOS DE TERAPIA CELULAR EM LESÃO RAQUIMEDULAR

Estudos experimentais comprovaram a capacidade do procedimento de terapia celular em modificar o quadro neurológico de espécimes submetidos a tratamento da lesão medular aguda ou crônica. Embora os mecanismos de ação não estejam completamente elucidados, o procedimento tem sido classificado como seguro, não sendo relatado complicações frequentes diretamente relacionadas ao procedimento.

Salienta-se que a lesão medular é uma patologia em que atualmente não há um tratamento direto que seja efetivo. Com base nos resultados dos estudos pré-clínicos apresentados anteriormente, iniciou-se na segunda metade da década passada, uma série de estudos clínicos em que se utilizou a terapia celular para tratamento de pacientes com lesão raquimedular.

Estes estudos foram classificados como estudos fase I e fase I/II, nos quais se tentava definir principalmente a segurança do procedimento além da potencial eficácia do método.

A maioria dos estudos revisados utilizou células-tronco hematogênicas caracterizadas como CD34<sup>+</sup> para a terapia celular (SYKOVA *et al*, 2006 ; CALLERA & NASCIMENTO, 2006; CHERNYKH *et al*, 2007; YOON *et al*, 2007; DEDA *et al*, 2008; GEFNER *et al*, 2008; CRISTANTE *et al*, 2009; KUMAR *et al*, 2009; FROLOV & BRYUKHOVETSKIY, 2012). A preferência por este tipo celular se deve à facilidade de obtenção, caracterização e, em muitos estudos, não foi necessária a expansão *in vitro* antes do transplante celular, demandando uma estrutura laboratorial menor.

Outros estudos utilizaram CMMO no procedimento de transplante celular (PAL *et al*, 2009; KISHK *et al*, 2010; PARK *et al*, 2010; BHANOT *et al*, 2011; JIANG *et al*, 2013; DAI *et al*, 2013). Nos estudos com este tipo celular, temos a mesma facilidade de obtenção e caracterização celular, porém é necessário um etapa de cultura *in vitro* para uma expansão satisfatória da população de CMMO.

Baseado no estudo experimental de Ramón-Cuerto (RAMÓN-CUETO *et al*, 1998) e na alta taxa de neurogênese das células-tronco de bainha olfatória, quatro estudos utilizaram esta estratégia para reparo de medula espinhal lesionada (MACKAY-SIM *et al*, 2008; CHHABRA *et al*, 2009; LIMA *et al*, 2010; HUANG *et al*, 2012). Por sua vez, três estudos utilizaram uma população celular heterogênea (METHA *et al*, 2008; SLEDTSOVA *et al*, 2010; YAZIDANE *et al*, 2013). Um outro estudo foi realizado utilizando células de Schwann (SABERI *et al*, 2008) e outro estudo utilizou células mesenquimais retiradas de

cordão umbilical (LIU *et al*, 2013).

Baseado em estudo experimental em que macrófagos cultivados com tecido danificado, por exemplo um enxerto de pele ou nervo, modificariam seu fenótipo para uma forma com características reparadoras, em oposição a macrófagos cultivados em contato com bactérias, que apresentam um fenótipo citotóxico (RAPALINO *et al*, 1998), foram realizados dois estudos clínicos do mesmo grupo em que esta estratégia era empregada para reparo de lesão medular (KNOLLER *et al*, 2005). O segundo estudo descrito como fase 2, foi o único estudo multicêntrico desta revisão. Contudo, ocorreu durante o estudo a perda do suporte financeiro, além da dificuldade de recrutamento, devido ao protocolo utilizado de lesão medular aguda com critérios rígidos de elegibilidade (JONES *et al*, 2010).

A maioria dos estudos utilizou a escala de avaliação neurológica da ASIA como padrão para acompanhamento neurológico. O exame de imagem de eleição foi a ressonância nuclear magnética e o exame funcional mais utilizado, o SSEP, que avalia a conexão entre o encéfalo e o sistema periférico.

Em cinco estudos, não se observou alteração neurológica após o transplante celular ou este não foi suficiente para modificar o score ASIA (MACKAY-SIM *et al*, 2008; CRISTANTE *et al*, 2009; PAL *et al*, 2009; YAZIDANE *et al*, 2013). Na conclusão de um dos artigos, inclusive, o autor desencoraja o procedimento de terapia celular com células mensenquimais devido aos poucos resultados obtidos com o seu estudo (BHANOT Y *et al*, 2011).

Outros autores discutiram sobre a segurança da técnica e da efetividade do procedimento relacionado à modificação do quadro neurológico apesar das limitações existentes, salientando a necessidade de um protocolo de estudo futuro que tenha as características de ser duplo cego e randomizado para normatizar o procedimento (JIANG *et al*, 2013; LIU *et al*, 2013; DAI *et al*, 2013).

#### 4.ARTIGO

O artigo intitulado “Neurological improvements After Autologous Transplantation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In Subjects With Chronic Spinal Cord Injury: a phase I/II study” descreve a metodologia empregada e os resultados obtidos com os pacientes tratados por este projeto. O artigo foi aceito para publicação na *Stem Cell Research and Therapy* em novembro de 2014.

**Neurological improvements After Autologous Transplantation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In Subjects With Chronic Spinal Cord Injury: a phase I/II study**

Marcus Vinícius Pinheiro Mendonça<sup>1</sup> (marcusvinicius1774@gmail.com);

Ticiane Ferreira Larocca<sup>2,3</sup> (ticiane@cbtc-hsr.org);

Bruno Solano de Freitas Souza<sup>2,3</sup> (bruno.souza@cbtc-hsr.org);

Cristiane Flora Villarreal<sup>2,4</sup> (cfv@ufba.br) ;

Luiz Flávio Maia Silva<sup>3</sup> (maialf@uol.com.br);

André Costa Matos<sup>3</sup> (andrecostamatos@yahoo.com.br);

Marco Antonio Novaes<sup>3</sup> (macnovaes@hotmail.com);

Cláudia Maria Pinheiro Bahia<sup>5</sup> (bahiaclaudia@ig.com.br);

Ana Carine de Oliveira Melo Martinez<sup>1</sup> (anacarinemartinez@hotmail.com);

Carla Martins Kaneto<sup>3</sup> (carlakaneto@gmail.com);

Sissi Brandão Carneiro Furtado<sup>3</sup> (sissi.furtado@hsr.com.br);

Geraldo Pedral Sampaio<sup>3</sup> (geraldopedral@gmail.com);

Milena Botelho Pereira Soares<sup>2,3,6</sup> (milena@bahia.fiocruz.br);

Ricardo Ribeiro dos Santos<sup>3</sup> (ricardoribeiro@cbtc-hsr.org).

1. Hospital Espanhol, Salvador, BA, Brazil; 2. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil; 3. Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil; 4. Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil; 5. Centro Universitário Estácio da Bahia – FIB, BA, Brazil.

6. Correspondence should be addressed to M.B.P.S, Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Avenida São Rafael, 2152, São Marcos, Salvador, BA. CEP: 41253-190. Tel:(+55 71) 3281-6455; Fax: (+55 71) 3281-6489. Email: [milena@bahia.fiocruz.br](mailto:milena@bahia.fiocruz.br)

## ABSTRACT

**Introduction:** The administration of stem cells holds promise as a potential therapy for spinal cord injury (SCI). Mesenchymal stem cells have advantages for clinical applications, since they can be easily obtained, are suitable for autologous transplantation and have been previously shown to induce regeneration of the spinal cord in experimental settings. Here we evaluated the feasibility, safety and potential efficacy of autologous transplantation of mesenchymal stem cells in subjects with chronic complete SCI. **Method:** We conducted a phase I/II, non-controlled study in 14 subjects of both genders aging between 18-65 years, with chronic traumatic SCI (> 6 months), at thoracic or lumbar levels, classified as ASIA A - complete injury. Baseline somatosensory evoked potentials (SSEP), spinal magnetic resonance imaging (MRI) and urodynamics were assessed before and after treatment. Pain rating was performed using the McGill Pain Questionnaire and a visual analogue score scale. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured and characterized by flow cytometry, cell differentiation assays and G-band karyotyping. Mesenchymal stem cells were injected directly into the lesion following laminectomy and durotomy. **Results:** Cell transplantation was an overall safe and well-tolerated procedure. All subjects displayed variable improvements in tactile sensitivity and eight subjects developed lower limb motor functional gains, principally in the hip flexors. Seven subjects presented sacral sparing and improved AIS grades to B or C – incomplete injury. Nine subjects had improvements in urologic function. One subject presented changes in SSEP three and six months after mesenchymal stem cells transplantation. Statistically significant correlations between the improvements in neurological function and both injury size and level were found. **Conclusion:** Intralesional transplantation of autologous mesenchymal stem cells in subjects with chronic, complete spinal cord injury is safe, feasible, and may promote neurological improvements.

**Keywords: adult stem cells; bone marrow; mesenchymal stem cells; spinal cord injury; paraplegia; clinical trial; cell therapy**

## **INTRODUCTION**

Severe spinal cord injury (SCI), leading to chronic paraplegia, is considered an irreversible condition for which there is currently no effective clinical therapy [1]. The main goal of stem cell therapy in SCI is to repair the damaged neuronal tissue. In experimental models of SCI, stem cell transplantation has been used as a new strategy to overcome physical disability and promote neurological improvements. Several studies have indicated a beneficial role of transplantation of different cell types, including bone marrow cells, neural progenitor cells and olfactory ensheathing cells into the injured spinal cord [2-6]. Another approach that has been tested is the use of oligodendrocyte progenitor cells to promote oligodendrogenesis after SCI, which led to remyelination and motor function improvement [7].

Results in pre-clinical studies have encouraged researchers to undertake clinical trials in spinal cord injury with cell therapy, mainly with mesenchymal stem cells (MSC), Schwann cells and human olfactory ensheathing glia [reviewed by Tator [8]]. Special attention has been given to MSC, which are shown to promote neural repair and regeneration of damaged areas in different experimental models [9-12]. MSC exhibit a broad degree of plasticity, with the ability to differentiate not only into multiple mesodermal lines, including bone, fat, muscle, liver and cartilage cells [13-17], but also into cells expressing neural and glial lineage markers [18, 19]. In addition, it has been reported that MSC secrete cytokines and growth factors that promote autocrine and paracrine effects, such as immunosuppression, inhibition of gliosis and apoptosis, enhanced angiogenesis, axon sorting and myelination [20, 21]. In previous studies, we have established a protocol for MSC intralesional transplantation in dogs and cats with naturally acquired spinal cord injury [22,23].

The clinical use of MSC presents several advantages, including easy isolation from bone marrow aspirates, large-scale expansion in culture and allowing autologous transplantations [18, 22]. Moreover, to date, in vivo tumor development has not been reported, neither in experimental models, nor in clinical trials, in which MSC were used to treat SCI [23-25]. We conducted here a clinical trial to evaluate the safety and potential efficacy of autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation in subjects with chronic thoracic and lumbar SCI caused by trauma.

## **METHODS**

### *Ethics statement*

This phase I/II nonrandomized, uncontrolled prospective open-label study was approved by the Brazilian National Council of Ethics in Research (CONEP) under the registration number 14942, SIPAR/MS: 25000.112358/2008-71 and was registered on NIH database (<http://www.clinicaltrials.gov>) under the number NCT01325103. Ethical guideline provisions from the Helsinki Declaration were followed. A written consent for participation and for publication was obtained from the subjects.

### *Objectives and outcomes*

The main objective was to evaluate the safety of autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation in subjects with chronic traumatic SCI. The secondary objective was to assess potential efficacy, through neurological improvements in sensory and motor assessment (measured by ASIA scores), pain scores, urodynamic and evoked potential studies.

The safety outcome was defined as deleterious modifications on resonance magnetic imaging, as well as possible side effects and adverse events related to the protocol procedures. The primary outcome was defined as neurological improvements on ASIA scores (light touch,



pin prick and motor power), as previously described [26]. The secondary outcomes were defined as improvements on pain scores, urodynamic study, and evoked potential somatosensory test. The subjects were followed up to 6 months postoperatively. All data were collected personally by the same researchers, through specific forms and validated questionnaires, in order to enhance the quality of measurements and results.

### *Subjects selection*

Fourteen subjects who fitted the following inclusion criteria were recruited: traumatic SCI at the thoracic or lumbar level, American Spinal Injury Association (ASIA) impairment scale (AIS) grade A, age  $\geq 18$  and  $\leq 65$  years and previous surgical intervention for spinal cord decompression and stabilization. The sample size was determined as the minimal number of subjects necessary to evaluate the procedure safety. All data were collected at Hospital São Rafael and Hospital Espanhol, in Salvador, Bahia, Brazil.

Exclusion criteria were anatomical transection of the spinal cord, open SCI (e.g. stabbing, gunshot wound), concurrent infectious disease, terminal illness, neurodegenerative disorders, primary hematological disorders, osteopathies, coagulopathies, hepatic dysfunction, other clinical complications that could contraindicate the surgery, use of metallic implants that contraindicate MRI and participation in other clinical trials.

Participants and researchers, those administering the interventions, and those assessing the outcomes, were not blinded to study condition assignment.

### *Isolation of bone marrow cells and MSC culture*

Before the procedure, subjects were assessed for hematology, blood biochemistry, urine microbiology and screening for HIV, HTLV, Chagas disease, and hepatitis B and C status. Bone marrow aspiration was performed in an outpatient surgery center. Subjects were

sedated prior to the procedure and monitored by an anesthesiologist. After local anesthesia using lidocaine 2%, approximately 60 ml of bone marrow were aspirated from the anterior and posterior iliac crest using a specific needle of bone marrow puncture of adjustable length (1.0 to 4.8 cm) and 15 gauge (Carefusion, San Diego, CA) and collected in 20 ml syringes containing 1 ml of heparin 5.000 UI (Cristália, Itapira, Brazil). The collection of bone marrow cells was performed by a hematologist at Hospital São Rafael, in Salvador, Bahia, Brazil.

Cell separation and culture procedures were performed in a certified cGMP facility using standardized procedures. The mononuclear cell fraction was separated from the bone marrow by centrifugation under Ficoll-Hypaque gradient (GE healthcare Life Sciences, Little Chalfont, United Kingdom) at 2000 RPM without break, at room temperature, for 30 minutes. After three washes in saline solution and plated in culture flasks (TPP, St. Louis, MO) at the density of  $1.3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. The cells were cultured in  $\alpha$ -MEM medium supplemented with L-glutamine (2 mM/L), 1% gentamycin, 2.4 g/L HEPES, 2g /L sodium bicarbonate (all from GIBCO, Grand Island, NY) and enriched with 15% fetal bovine serum (FBS; Hyclone/Thermo Scientific, Logan, UT). Half of the medium was exchanged every 3 days. Once the cells achieved 80-90% confluence, they were dissociated with 0.25% porcine trypsin/0.53 mM EDTA (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, NY) and replated at a density of 8000 cells/cm<sup>2</sup>. MSC were expanded for approximately four weeks, until adequate transplantation numbers were achieved. Confluent autologous MSC at passage 3 to 5 were resuspended in saline solution containing 20% human serum albumin (CSL Behring, King of Prussia, PA). MSC suspensions ( $1 \times 10^7$  cells/mL) were transferred into 1 mL syringes for local injection in subjects. Before transplantation, the cells were characterized by flow cytometry analysis, differentiation assays, G-band karyotype analysis and tested for sterility.

### *Cell differentiation assays*

To assess the differentiation potential of MSC, 40,000 cells/ml were cultured in 24-well plates (Greiner, Monroe, NC) with coverslips for performing morphological studies. When differentiation was initiated, the entire culture medium was removed and replaced by induction medium (specific for osteoblasts, adipocytes and chondrocytes) or only  $\alpha$ -MEM medium supplemented with 7.5% FBS as control. Commercial kits were used for adipogenic, chondrogenic and osteogenic induction media following manufacturer's recommendations (StemPro adipogenesis Differentiation Kit, StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit and StemPro Osteogenesis Differentiation Kit; GIBCO). MSC were continuously evaluated by phase contrast microscopy, during the differentiation process. Histochemical staining was also used for cell morphology evaluation during the differentiation process. MSC differentiated into adipocytes and their controls were stained with Sudan II for visualization of lipid inclusions. The cells that differentiated into chondrocytes and their controls were stained with Alcian Blue for staining of proteoglycan deposits. Cells that differentiated into osteoblasts and their controls were stained with Von Kossa for visualization of mineralized matrix. Morphological evaluation of cells was performed using an AX70 optical microscope coupled to a digital camera for imaging capture (Olympus, Tokyo, Japan).

### *Flow cytometry analysis*

For immunophenotyping, adherent MSC were detached with 0.25% porcine trypsin solution (Invitrogen), washed with saline and incubated at 4°C for 30 minutes with the following antibodies: FITC anti-human CD31, PE anti-human CD34, PE anti-human CD117, PE anti-human CD14, APC anti-human CD90, PE anti-human CD79a, APC anti-human CD44, PerCP anti-human CD45, FITC anti-human CD19 (all from BD-Pharmingen, San Diego, CA) and FITC anti-human CD105 (R&D Systems, Minneapolis, MN). The acquisition

and analysis were done using a LSR Fortessa cytometer with the FACSDiva software (Becton Dickinson, San Jose, CA). At least 10,000 events were collected.

#### *Cytogenetic evaluation*

Cytogenetic analysis was performed in MSC samples from all subjects, during every passage. All of the analyses were performed prior to transplantation in order to detect possible chromosomal mutations induced by culture conditions. MSC were treated with 16 µg/ml colchicine (Cultilab, Campinas, Brazil) for a period of six hours, for cell cycle arrest at metaphase. Cells were trypsinized, resuspended, centrifuged, exposed to hypotonic solution of 0.075 M KCl, placed in a water bath at 37°C for 30 min and fixed with Carnoy's solution 3:1 (acetic acid / methanol).

Cytogenetic analysis was performed by GTG banding technique. G banding for the prepared slides were aged at 60 °C overnight and subjected to treatment with a solution of 0.1% trypsin / PBS and subsequently stained with Giemsa solution / PBS. 20 cells were analyzed for each passage. The analysis of these cells was performed using a BX61 microscope (Olympus) and images were captured using a digital imaging system (Applied Spectral Imaging, Carlsbad, CA) coupled to the microscope. Results were interpreted according to the international classification ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature).

#### *Cell transplantation and subjects follow up*

Subjects in the prone position under general anesthesia underwent a midline incision comprised of two levels above and two levels below the injury. Following laminectomy and decompression of the injured spinal canal segment, the dura mater was opened under the microscope to visualize the injured spinal segment. A fixed cell number ( $5 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup>) was

injected per lesion volume. The estimation of lesion volume was performed by MRI analysis, using the ellipsoid formula, as described previously [27].

The injection was performed over a period of 5 minutes. Punctures were made in the cardinal directions of the injured area and one level above and below, before closing the dura mater. The whole procedure was performed only once, by a neurosurgeon, at Hospital Espanhol, in Salvador, Bahia, Brazil.

As an incentive strategy, in order to increase compliance, subjects underwent rehabilitation for six months after the surgery, five times a week, for four hours a day during the first two months and two hours a day in the subsequent months. Regular clinical and neurological assessments were performed for at least six months. At each follow-up, a complete clinical assessment, neurological evaluation, and AIS scale assessment were conducted. An urodynamic study, SSEP and MRI of the spine were carried out in the 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> months of follow-up.

#### *Clinical pain measures*

All pain measurements were performed in a quiet room with temperature maintained between 21 and 23°C. At the time of testing, subjects rated their present pain using an unanchored visual analogue score (VAS). Data from VAS scale were presented in millimeters. Next, subjects were asked to indicate where they were currently experiencing chronic pain by shading in the areas on a drawing of the dorsal and frontal views of the human body. Following this, subjects were also asked to fill in a standard Brazilian-Portuguese language version of the McGill Pain Questionnaire [28], the results of which were then quantified using the pain rating index (PRI) [29].

### *Sensory assessment*

Test sites were identified based on anatomical landmarks to ensure that the same site could be accurately located in subsequent sessions. For each participant, a starting stimulation site was selected based on each individual's level of injury, as determined by the American Spinal Injury Association (ASIA) scale. The starting site was defined as areas at least four dermatomes above the neurological level of injury, where sensation was expected to be within normal limits. Mechanical stimulation response was measured with calibrated von Frey filaments (Touch Test Sensory Evaluator; Stoelting, Wood Dale, IL). Each subject was instructed to close his or her eyes during this portion of the testing and respond with a "yes" if he or she could feel the test stimulus when it was delivered or with a "no" if he or she could not feel the stimulus. For each trial, the monofilament (10 g) was applied perpendicular to the skin surface and, once the filament was fully bent, was held in place for approximately 1 s before being lifted off the skin. Following a positive response, the next area below was stimulated.

### *Urodynamics*

The urodynamic study was performed prior to and 3 to 6 months after the transplantation of mesenchymal stem cells. The following parameters were measured at cystometry: maximum bladder capacity, compliance, bladder sensation, presence of detrusor overactivity, and presence of urinary incontinence.

Compliance was measured when the bladder showed filling ability greater than 200 ml in the absence of detrusor overactivity. Bladder sensation was marked as absent, partially preserved or completely preserved, as previously described [30].

Those subjects with micturition were also evaluated with the pressure-flow study. For the urodynamic study, we used a Dynamed Dynapack MPX816 equipment. For cystometry,

two plastic urethral probes were inserted into the bladder (6 Fr to measure intravesical pressure and 8 Fr for filling). A 10 Fr rectal probe was inserted for measuring intra-abdominal pressure. The filling was done with distilled water at room temperature at a rate of 40 ml/min.

#### *Somatosensory evoked potentials (SSEP)*

The somatosensory evoked potentials (SSEP) were evaluated before, 3 and 6 months after MSC transplantation. The exams were performed using a Neuropack M1 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) four channel equipment, with tibial nerve stimulation for evaluation of the lower limbs, and registration in the popliteal fossa, lumbar (L2 /3) and scalp (Cz' - Fpz) regions, and median nerve stimulation for evaluation of the upper limbs, with registration at Erb's point, cervical C5 and scalp (C3'-C4'). In the event that some potentials were obtained, the evaluation was replicated at least three times to assess consistency.

#### *Statistical analyses*

The individual was the smallest unit that was analyzed to assess intervention effects (same from the unit of assignment). Missing data were not used.

Paired *t* test was used to analyze ASIA scores for light touch and pin prick, before and 6 months after transplantation. Nonparametric Wilcoxon signed rank test was employed to test the existence of a statistically significant difference between ASIA lower limb motor scores before and 6 months after transplantation. Pearson correlation analysis was performed to evaluate possible correlations between ASIA scores (light touch, pin prick and motor power) and lesion characteristics (volume, level and time of lesion). Statistical analyses were performed using Prism Software (version 3.0; GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered significant if *P* was equal to or less than 0.05.

## **RESULTS**

### *Subjects*

Regarding the enrollment, 555 participants were screened for eligibility, 205 were found to be eligible, and 14 were enrolled (10 males), following the order of first contact date. Fourteen subjects were assigned to the study condition and were submitted to bone marrow aspiration and mesenchymal stem cell transplantation. Of the 14 subjects assigned, two were considered to have lost follow-up, one due to leg and urethral injuries unrelated to the study protocol, and the other due to lack of compliance with the assessments. These two subjects, considered as non-compliers, were excluded from the main analysis.

Subjects had chronic traumatic SCI with a mean duration of approximately 61.7 months (ranging from 18 to 180 months). Four subjects were female and 10 were male, with mean age of  $35.7 \pm 9.9$  years, ranging from 23 to 61. All were classified as ASIA A and had injuries in the lumbar or thoracic segments of the spinal cord. The lesion volumes were estimated by MRI analysis, with a mean of approximately  $3.66 \text{ cm}^3$ , ranging from  $0.77$  to  $10.44 \text{ cm}^3$ . The demographic, clinical, radiological and neurological features of the subjects are shown in Table 1.

### *Study protocol deviations*

Urodynamics data were not properly collected due to recurrent urinary infection in some of the subjects, who could not be submitted to the urodynamic study in the correct timeframe.

### *MSC characterization*

Cultured bone marrow-derived cells presented a fibroblast-like morphology and showed  $97.4 \pm 3.1\%$  cells positive for CD105,  $97.5 \pm 2.8\%$  cells positive for CD73 and  $96.6 \pm 3.5\%$  cells positive for CD90. Moreover, MSC cultures presented  $2.0 \pm 2.1\%$  cells positive for



CD45,  $2.3 \pm 2.6\%$  cells positive for CD14,  $2.4 \pm 3.0\%$  cells positive for CD79 and  $2.3 \pm 2.5\%$  cells positive for CD34. The MSC were successfully induced to differentiate into chondrocytes, osteocytes and adipocytes (Fig. 1). Additionally, no chromosomal aberrancies were detected in G-band karyotype analysis in the passages used for transplantation (Fig. 2).

### *Adverse effects*

Transplantation of bone marrow derived MSC was an overall safe procedure. All of the subjects were discharged within 48 hours after surgery. The most frequent post-operative symptom was low-intensity pain at the incision site, which were responsive to regular analgesics. One subject developed a post-operative complication, evolving a cerebrospinal fluid leak that was treated by an additional surgical procedure. None of the subjects had fever, infection or meningitis. Subjects underwent a program of rehabilitation beginning one week after the surgical procedure, which was well tolerated.

### *Clinical assessments*

Neurological evaluation revealed variable improvements in sensitivity below the lesion level following treatment, as assessed by light touch and pin prick (Figs. 3A and B). Light touch and pin prick ASIA sensitivity score analysis, prior to and 6 months after transplantation, demonstrated a statistically significant improvement ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively; paired  $t$  test). All subjects showed some degree of sensitivity gain in response to mechanical stimulation, when measured with von Frey monofilaments (50% had significant improvements, comparing to the pre-surgical profile). Subject #1 demonstrated sensitivity recovery in all dermatomes (Table 2). Major sensitivity gains were measured in the first three months after MSC transplantation (Figs. 3A and B; Table 2). Pearson coefficient showed an inverse correlation between light touch gain 6 months after transplantation and lesion volume

( $r^2=0.3486$ ; Fig. 4A). No significant correlations were observed when light touch or pin prick sensitivity gains were analyzed in relation to level or time of lesion.

Improvements in lower limb motor function were observed in eight subjects (Fig. 3C). Two subjects presented gains in hip flexor function, three had gains in knee extension movement and three demonstrated gains in ankle dorsiflexion. The most frequent alteration was the increased motor power observed in hip-related muscle groups. A statistically significant improvement in ASIA lower limb motor scores was observed when comparing sensitivity before and six months after transplantation ( $P<0.05$ ; Wilcoxon signed rank test). Pearson coefficient demonstrated a direct correlation between motor gain and lesion level ( $r^2=0.6386$ ), six months after transplantation (Fig. 4B). No significant correlations were seen when motor gains were analyzed in relation to volume or time of lesion.

Additionally, seven subjects presented sacral sparing after MSC transplantation, having recovered anal sensation. Of these, six subjects had changes in the AIS grade to grade B and one to grade C (Table 3).

### *Urological study*

During the complete treatment and evaluation period, renal function did not deteriorate in any of the subjects. The maximum cystometric capacity changed from  $203 \pm 113$  ml to  $242 \pm 146$  ml, without statistical significance. Bladder compliance improved significantly from  $14.7 \pm 8.2$  to  $25.4 \pm 15.9$  ml/cmH<sub>2</sub>O ( $P= 0.02$ ). Five subjects, who presented bladder sensation previously classified as absent, improved to present a reduced sensation. Ten subjects began this study presenting detrusor overactivity during bladder filling; however, following MSC transplantation, four of these subjects increased the filling volume, while three subjects

decreased the filling volume up to the first involuntary contraction. Throughout the study, all subjects remained with urinary incontinence and in need of intermittent urinary catheterization.

### *Radiological evaluation*

Nuclear magnetic resonance images (MRI) obtained before MSC transplantation revealed the presence of spinal cord cavities in eight subjects and syrinx in two subjects. Atrophy cord areas and gliosis, as well as findings associated with the primary surgery (i.e. epidural fibrosis, soft tissue), were found in all subjects. MRI analysis three and six months after MSC transplantation revealed no alterations in hyperintense signals, extension of cavities or appearance of new gliosis areas. Moreover, no signs of ectopic tissue formation were observed during the follow-up.

### *Pain assessment*

Three subjects referred transient worsening of neuropathic pain, which was pharmacologically controlled. Three subjects ameliorated the neuropathic pain three months post-treatment, with significant reduction of pharmacological therapy dependency.

Clinical pain measurements, administered through VAS and PRI from the McGill Pain Questionnaire, were assessed prior to and one, three and six months following MSC transplantation (Table 4). Although a reduction in VAS and PRI was observed in 67% of subjects six months after surgery, there were no statistically significant differences observed when subjects were compared at zero and six months after MSC transplantation ( $P=0.0538$  and  $P=0.1211$ , respectively; paired  $t$  test).

### *Somatosensory evoked potential*

Subjects were assessed for somatosensory evoked potentials (SSEP) before, three and six months after MSC transplantation. Lower sensory nerve electrical stimulation-mediated SSEP were not evoked in any subject prior to transplantation. Only one subject (#14) presented an improved SSEP response in the left side three months after MSC transplantation, which was maintained until the follow-up conclusion. Despite the fact that the SSEP recorded in this subject presented a low amplitude, it was consistent and demonstrated the cortical response in P37/N45 in the left side.

## **DISCUSSION**

A growing body of evidence, both experimental as well as clinical, has demonstrated that spontaneous plasticity events may occur within the post-traumatically injured spinal cord, through mechanisms including: alterations in the properties of spared neuronal circuits, intact or injured axon collateral sprouting and synaptic rearrangements, as reviewed by Onifer *et al* [31]. Nonetheless, although there is an abundance of studies describing the natural history of neurologic functional gains during the first year post-SCI, there is a lack of data regarding the degree of neurological recovery that may naturally occur during prolonged follow-up investigation. A previous study described that 16.9% of subjects with complete SCI improved motor levels between the 1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup> years after SCI, which went on to demonstrate an improvement from a complete to an incomplete injury in 5.6% of those subjects [32].

In the present study we enrolled subjects with chronic and complete spinal cord injury (ASIA A) whom had previously been subjected to decompressive surgery and lengthy rehabilitation protocols without acquiring significant motor or sensory gains. Locomotor training has been shown to improve the recovery of walking in many subjects with incomplete SCI, but not in subjects with severe injury [33].

Since our primary outcome was safety, we described adverse event in only one subject, which presented a cerebrospinal fluid leak as a postoperative complication not related to the mesenchymal stem cells, but rather to the surgical procedure. Cerebrospinal fluid leak is not a routine complication, however, it may happen in a frequency of 9% of open spine surgeries [34]. It is considered as a minor complication, since usually it does not change the outcome of the surgery.

Although this was not a controlled study, based on the subject profiles and the expected spontaneous gains, our study showed potential benefits of MSC transplantation treatment, in variable degrees of motor and sensory improvements, clinical pain measures and urodynamics parameters. Importantly, we showed that MSC transplantation resulted in the conversion from complete to incomplete injury in seven subjects (58.3%), which was accompanied by improvement in AIS score to grade B or C.

Results obtained in other clinical trials using MSC for SCI were not as encouraging as those demonstrated here. A study performed with 67 subjects receiving autologous MSC injections intralesionally and intrathecally reported improvements only in one subject, which was considered to be part of the natural history of the disease [23]. A study by Park *et al* (2012) showed significant improvement in three of 10 subjects submitted to intramedullary injection, followed by intrathecal administration of MSC [24]. Another study evaluated the potential of MSC injected intrathecally to enhance rehabilitation in 63 subjects with chronic SCI. In the MSC group (consisting of 40 grade A subjects), 12 subjects improved their AIS score of A to B or C (a conversion rate of 30%), with no statistically significant difference when compared to the control group [35]. Karamouzian and co-workers (2012) also tested the safety and feasibility of MSC transplantation by lumbar puncture in 11 subjects, in a non-randomized clinical trial, comparing the results with those of 20 control subjects who received conventional treatment. Although 5 of 11 subjects (45.5%) in the study group and 3 in the

control group (15%) demonstrated improvements, there was no statistical significance between the two groups [25].

Variability of the results may be caused by the different numbers of cells, routes and regimen of administration. These are considered key factors for the development of optimized cell-based therapies [36]. The dose and administration routes applied in the present study were established in previous pre-clinical studies conducted by our group [37, 38]. Based on these pre-clinical studies, the present trial was the only one to adjust the number of cells administered into the spinal cord to the injury size estimated by MRI. Moreover, considering the studies that used the intra-spinal injection for MSC delivery, in the present study, the number of MSCs was considerably higher than the others, ranging from  $4 \times 10^6$  to  $5 \times 10^7$  (median:  $2 \times 10^7$ ) versus  $3-8 \times 10^6$  [23] and  $8 \times 10^6$  [24].

A recent study evaluated the outcome of 399 subjects with complete thoracic spinal cord injuries and described a correlation between lower spinal cord injury level (T10-T12) and improved motor function [39]. Although the number of subjects evaluated in our study was less than the aforementioned investigation, we did observe a direct correlation between motor gain and injury level in SCI subjects that received MSC transplantation. Additionally, we found an inverse correlation between light touch gain six months after transplantation and volume of the lesion. These results suggest that characteristics of the spinal cord lesion influence the efficacy of the cell therapy, which has not been described before.

Regarding the urodynamics study, we demonstrated a significant enhancement in bladder compliance, which may be an early indication of future improvements in urinary function. Another urodynamic parameter that improved in half of the subjects was bladder sensation, which is critical for the subject to feel the optimal moment to initiate bladder emptying. Improvements in bladder sensation avoid elevated filling pressures, which are

deleterious to the upper urinary tract. Improvements in sense of bladder filling was seen in only one out of 13 subjects enrolled in a previous study which evaluated the effects of autologous MSC in subjects with chronic spinal cord injury [23].

The cell therapy protocol administered in this study was feasible and an overall safe procedure, which capitalized on the use of an autologous and easily obtainable source of cells. Importantly, our data corroborates with those obtained in previous studies, in which MSC administered directly into the injured spinal cord was also considered safe, even when combined with additional MSC administrations applied by lumbar puncture [23, 24].

To rehabilitate subjects bearing complete SCI for long periods, such as those enrolled in our study, is challenging task. The loss of motor function control as a result of interrupted pathways within the spinal cord after injury has severe consequences for movement recovery, which includes muscle atrophy, joint instability and bone weakness. This suggests that an autologous cell therapy approach, applied as early as possible, may be vital to minimize the development of the deleterious secondary outcomes following SCI and to lead to an increase in likelihood of motor recovery. Moreover, the combination of a cell-based therapy with other known factors that potentiate the plasticity of the central nervous system may increase functional recovery [31]. Additionally, the level of measurable benefits that can be achieved may depend on several factors, including the number of MSC injected into the lesion site and doses, as well as therapeutic window, all of which need to be further investigated, in order to optimize the effects of MSC-based therapy for SCI.

## **CONCLUSIONS**

The present study has demonstrated the safety, feasibility and potential efficacy of autologous MSC administration into subjects with chronic SCI. Moreover, injury characteristics, such as level and size, were found to influence the outcome of cell therapy for

SCI. The results indicate potential benefits provided by MSC therapy, which should be confirmed in larger and controlled clinical trials.

## **LIST OF ABBREVIATIONS**

ASIA: American Spinal Injury Association  
AIS: American Spinal Injury Association impairment scale  
NIH: National Institute of Health  
cGMP: current good manufacturing practice  
RPM: rotations per minute  
 $\alpha$ -MEM: minimum essential medium Eagle, alpha modifications  
EDTA: ethylenedinitrilotetraacetic acid  
FITC: fluorescein isothiocyanate  
PE: phycoerythrin  
PerCP:peridinin chlorophyll protein  
APC: allophycocyanin  
CNPq: Brazilian National Research Council  
FINEP: Studies and Projects Funding Body

## **COMPETING INTERESTS**

The authors declare they have no competing interests.

## **AUTHORS CONTRIBUTIONS**

MVPM, TFL, BSFS: conception and design, critical revision, data collection and analysis, manuscript writing, final approval of the manuscript. CFV, LFMS, ACM, MAN, CMPB, ACOMM, CMK, SBCF, and GPS: data collection and analysis, final approval of the manuscript. MBPS, and RRS: conception and design, critical revision, manuscript writing, and final approval of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to thephysiotherapy team, which performed the subjectsrehabilitation protocols. This work was financially supported by the Brazilian Ministry of Health, CNPq and FINEP. The authors thank Dr. Kyan James Allahdadi for careful reviewing of the manuscript.



## REFERENCES

1. Rolls A, Shechter R, Schwartz M: **The bright side of the glial scar in CNS repair.***Nat Rev Neurosci* 2009, **10**:235-241.
2. Barnabé-Heider F, Frisé J: **Stem cells for spinal cord repair.***Cell Stem Cell* 2008, **3**:16-24.
3. Parr AM, Tator CH, Keating A: **Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury.***Bone Marrow Transplant* 2007, **40**:609-619.
4. Ramer LM, Au E, Richter MW, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ: **Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury.***J Comp Neurol* 2004, **473**:1-15.
5. Pearse DD, Sanchez AR, Pereira FC, Andrade CM, Puzis R, Pressman Y, Golden K, Kitay BM, Blits B, Wood PM, Bunge MB: **Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery.***Glia* 2007, **55**:976-1000.
6. Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H: **Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats.***J Neurosci Res* 2002, **69**:925-933.
7. Cao Q, He Q, Wang Y, Cheng X, Howard RM, Zhang Y, DeVries WH, Shields CB, Magnuson DS, Xu XM, et al: **Transplantation of ciliary neurotrophic factor-expressing adult oligodendrocyte precursor cells promotes remyelination and functional recovery after spinal cord injury.***J Neurosci* 2010, **30**:2989-3001.
8. Tator CH: **Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties, and recommendations.***Neurosurgery* 2006, **59**:957-982; discussion 982-957.
9. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, Mantegazza R, Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A: **Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis.***Ann Neurol* 2007, **61**:219-227.
10. 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 U S A* 2002, **99**:2199-2204.
11. Neuhuber B, Timothy Himes B, Shumsky JS, Gallo G, Fischer I: **Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations.***Brain Res* 2005, **1035**:73-85.
12. Zhang J, Li Y, Lu M, Cui Y, Chen J, Noffsinger L, Elias SB, Chopp M: **Bone marrow stromal cells reduce axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis mice.***J Neurosci Res* 2006, **84**:587-595.
13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.***Science* 1999, **284**:143-147.
14. Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE, Caplan AI: **A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells.***Exp Cell Res* 1995, **219**:211-222.
15. Richardson SM, Curran JM, Chen R, Vaughan-Thomas A, Hunt JA, Freemont AJ, Hoyland JA: **The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into**

- chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds.*Biomaterials* 2006, **27**:4069-4078.**
16. Wakitani S, Saito T, Caplan AI: **Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine.***Muscle Nerve* 1995, **18**:1417-1426.
  17. Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY: **Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro.***World J Gastroenterol* 2005, **11**:3479-3484.
  18. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM: **From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice.***Science* 2000, **290**:1775-1779.
  19. Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Strazzer S, Salani S, Del Bo R, Caccialanza M, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP: **Neuroectodermal and microglial differentiation of bone marrow cells in the mouse spinal cord and sensory ganglia.***J Neurosci Res* 2002, **70**:721-733.
  20. Caplan AI, Dennis JE: **Mesenchymal stem cells as trophic mediators.***J Cell Biochem* 2006, **98**:1076-1084.
  21. Carlson KB, Singh P, Feaster MM, Ramnarain A, Pavlides C, Chen ZL, Yu WM, Feltri ML, Strickland S: **Mesenchymal stem cells facilitate axon sorting, myelination, and functional recovery in paralyzed mice deficient in Schwann cell-derived laminin.***Glia* 2011, **59**:267-277.
  22. Kitchel SH, Wang MY, Laurysen CL: **Techniques for aspirating bone marrow for use in spinal surgery.***Neurosurgery* 2005, **57**:286-289; discussion 286-289.
  23. Bhanot Y, Rao S, Ghosh D, Balaraju S, Radhika CR, Satish Kumar KV: **Autologous mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury.***Br J Neurosurg* 2011, **25**:516-522.
  24. Park JH, Kim DY, Sung IY, Choi GH, Jeon MH, Kim KK, Jeon SR: **Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans.***Neurosurgery* 2012, **70**:1238-1247; discussion 1247.
  25. Karamouzian S, Nematollahi-Mahani SN, Nakhaee N, Eskandary H: **Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients.***Clin Neurol Neurosurg* 2012, **114**:935-939.
  26. Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, Johansen M, Jones L, Krassioukov A, Mulcahey MJ, et al: **International standards for neurological classification of spinal cord injury (revised 2011).***J Spinal Cord Med* 2011, **34**:535-546.
  27. Weisstein EW: **Ellipsoid.** From *MathWorld* - A Wolfram Web Resource.: <http://mathworld.wolfram.com/Ellipsoid.html>.
  28. Varoli FK, Pedraza V, vol. 17. pp. 328-335. **Braz. Dent. J.**; 2006:328-335.
  29. Melzack R: **The McGill Pain Questionnaire: major properties and scoring methods.***Pain* 1975, **1**:277-299.
  30. Ersoz M, Akyuz M: **Bladder-filling sensation in patients with spinal cord injury and the potential for sensation-dependent bladder emptying.***Spinal Cord* 2004, **42**:110-116.
  31. Onifer SM, Smith GM, Fouad K: **Plasticity after spinal cord injury: relevance to recovery and approaches to facilitate it.***Neurotherapeutics* 2011, **8**:283-293.
  32. Kirshblum S, Millis S, McKinley W, Tulskey D: **Late neurologic recovery after traumatic spinal cord injury.***Arch Phys Med Rehabil* 2004, **85**:1811-1817.
  33. Wirz M, Colombo G, Dietz V: **Long term effects of locomotor training in spinal humans.***J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001, **71**:93-96.

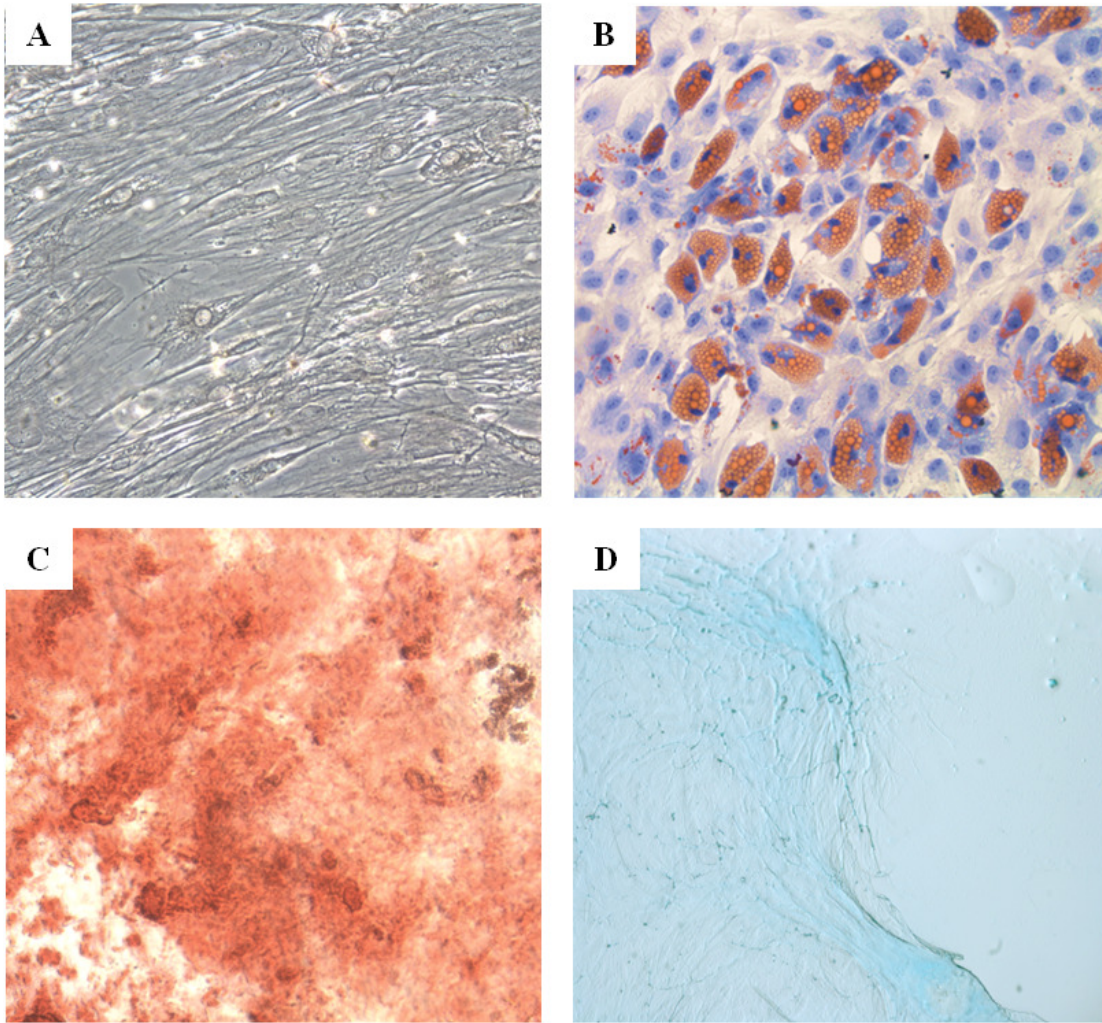
34. Wong AP, Shih P, Smith TR, Slimack NP, Dahdaleh NS, Aoun SG, El Ahmadieh TY, Smith ZA, Scheer JK, Koski TR, et al: **Comparison of symptomatic cerebral spinal fluid leak between patients undergoing minimally invasive versus open lumbar foraminotomy, discectomy, or laminectomy.***World Neurosurg* 2014, **81**:634-640.
35. Kishk NA, Gabr H, Hamdy S, Afifi L, Abokresha N, Mahmoud H, Wafaie A, Bilal D: **Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury.***Neurorehabil Neural Repair* 2010, **24**:702-708.
36. Goldring CE, Duffy PA, Benvenisty N, Andrews PW, Ben-David U, Eakins R, French N, Hanley NA, Kelly L, Kitteringham NR, et al: **Assessing the safety of stem cell therapeutics.***Cell Stem Cell* 2011, **8**:618-628.
37. Penha EM, Aguiar PH, Barrouin-Melo SM, de Lima RS, da Silveira AC, Otelto AR, Pinheiro CM, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB: **Clinical neurofunctional rehabilitation of a cat with spinal cord injury after hemilaminectomy and autologous stem cell transplantation.***Int J Stem Cells* 2012, **5**:146-150.
38. Penha EM, Meira CS, Guimarães ET, Mendonça MV, Gravely FA, Pinheiro CM, Pinheiro TM, Barrouin-Melo SM, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB: **Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs.***Stem Cells Int* 2014, **2014**:437521.
39. Zariffa J, Kramer JL, Fawcett JW, Lammertse DP, Blight AR, Guest J, Jones L, Burns S, Schubert M, Bolliger M, et al: **Characterization of neurological recovery following traumatic sensorimotor complete thoracic spinal cord injury.***Spinal Cord* 2011, **49**:463-471.

## FIGURE LEGENDS

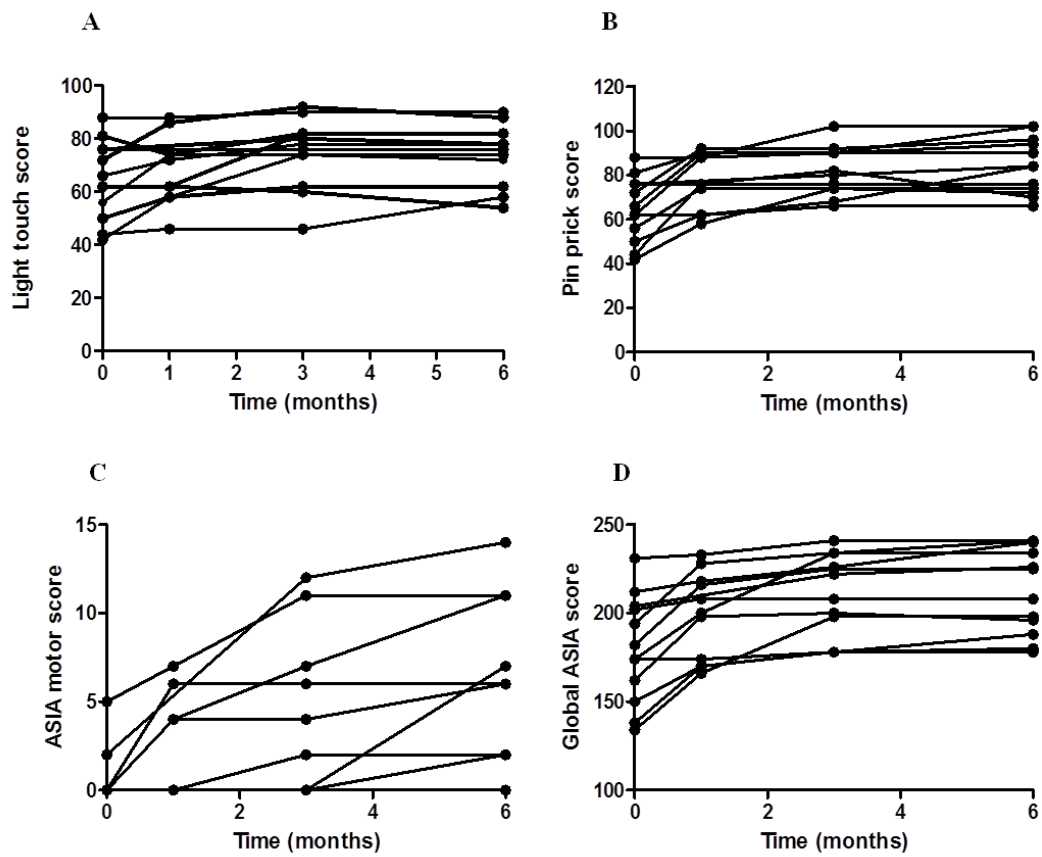
**Figure 1: Cell differentiation assays.** Mesenchymal stem cells (A) were cultured in the presence of adipogenic (B), osteogenic (C) and chondrogenic (D) differentiation media. Cultures were stained with Sudan II, von Kossa and Alcian blue, respectively. Representative images obtained from MSC cultures from one patient. Magnification=400X.

**Figure 2: ASIA scores before and during follow up.** Sensory scores evaluated by the light touch (A) and pin prick (B). (C) ASIA motor score (legs). \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ .

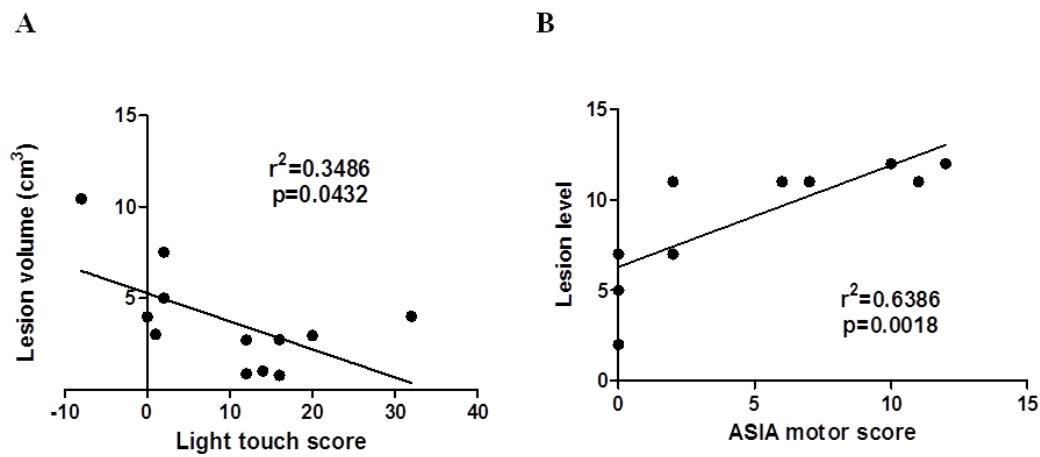
**Figure 3: Analyses of correlation between lesion characteristics and ASIA scores.** (A) Pearson correlation analysis of lesion volume ( $\text{cm}^3$ ) and light touch ASIA score. (B) Pearson correlation analysis of lesion level and ASIA motor improvement. Lesion level was consecutively numbered starting from T1.



**Figure 1: Cell differentiation assays.** Mesenchymal stem cells (A) were cultured in the presence of adipogenic (B), osteogenic (C) and chondrogenic (D) differentiation media. Cultures were stained with Sudan II, von Kossa and Alcian blue, respectively. Representative images obtained from MCS cultures from one patient.



**Figure 2: ASIA scores before and during follow up.** Sensory scores evaluated by the light touch(A) and pin prick (B). (C) ASIA motor score in the legs. (D) Global ASIA score.



**Figure 3: Analyses of correlation between lesion characteristics and ASIA scores.**

(A) Pearson correlation analysis of lesion volume (cm<sup>3</sup>) and light touch ASIA score. (B)

Pearson correlation analysis of lesion level and ASIA motor improvement. Lesion level was consecutively numbered starting from T1.

## TABLES

Table 1. Demographic, clinical and neurological features of the subjects

Subject	Months post-SCI	SCI Level	AIS Grade	Lesion (cm <sup>3</sup> )
1	101	T12	A	2.7
2	42	T5	A	1.0
3	36	L1	A	5.4
4	25	T12	A	5.0
5	18	T5	A	1.0
6	29	T7	A	2.7
7	91	T5	A	4.0
8	153	T12	A	4.0
9	180	T12	A	0.8
10	27	T5	A	0.9
11	52	T12	A	7.5
12	19	T7	A	10.4
13	66	T7	A	3.0
14	26	T12	A	3.0

SCI: spinal cord injury; AIS: ASIA impairment scale.



**Table 2. Response to mechanical stimulation**

<b>Subject</b>	<b>Dermatomes with positive response to von Frey stimulation*</b>			
<b>number</b>	<b>Before</b>	<b>Months after treatment</b>		
	<b>treatment</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
<b>1</b>	T11/T11	L1/L1	ALL	ALL
<b>4</b>	L2/L2	L2/L3	L3/S2	S2/S2
<b>5</b>	T4/T4	T4/T4	T5/T4	T5/T4
<b>6</b>	T5/T4	T5/T5	T6/T5	T6/T6
<b>7</b>	T4/T3	T5/T4	T5/T4	T5/T4
<b>8</b>	T11/T11	T12/T12	T12/T12	T12/T12
<b>9</b>	T12/L1	L3/L3	L3/L3	L3/L3
<b>10</b>	T5/T5	T5/T6	T6/T6	T7/T6
<b>11</b>	T11/L1	L1/L2	L1/L2	L2/L2
<b>12</b>	T4/T4	T5/T5	T6/T5	T6/T5
<b>13</b>	T5/T4	T7/T6	T8/T6	T7/T6
<b>14</b>	T11/T10	T12/T11	L1/T11	L5-S1/T12

\* Side of the body (right/left).

**Table 3. Summary of AIS grades**

<b>Subject</b>	<b>Baseline</b>	<b>3 months</b>	<b>6 months</b>
<b>1</b>	A	A	B
<b>4</b>	A	A	A
<b>5</b>	A	A	A
<b>6</b>	A	A	A
<b>7</b>	A	A	A
<b>8</b>	A	B	B
<b>9</b>	A	B	B
<b>10</b>	A	A	B
<b>11</b>	A	A	C
<b>12</b>	A	A	A
<b>13</b>	A	B	B
<b>14</b>	A	B	B

---

AIS: ASIA impairment scale.

Table 4. Clinical pain measures

Subject	VAS				PRI			
	Before	Months after treatment			Before	Months after treatment		
		1	3	6		1	3	6
<b>1</b>	3.0	0	0	0	6.6	0	0	<b>0</b>
<b>4</b>	5.0	5.0	6.0	6.0	17.0	19.3	16.5	<b>20.5</b>
<b>5</b>	4.0	6.0	6.0	0	8.5	14.5	11.0	<b>0</b>
<b>6</b>	6.0	6.0	7.0	3.0	17.2	25.0	30.3	<b>13</b>
<b>7</b>	1.0	0	0	0	7.0	0	0	<b>0</b>
<b>8</b>	7.0	7.0	7.0	7.0	26.4	24.0	26.4	<b>31.2</b>
<b>9</b>	10.0	8.0	8.0	8.0	33.7	29.5	24.3	<b>22.2</b>
<b>10</b>	5.0	3.0	7.0	7.0	11.3	10.6	24.8	<b>18.1</b>
<b>11</b>	8.0	8.0	7.0	0	40.5	37.0	44.9	<b>0</b>
<b>12</b>	6.5	3.0	3.0	3.0	23.8	8.4	15.6	<b>10.9</b>
<b>13</b>	6.0	0	7.0	8.5	28.5	0	21.1	<b>41.1</b>
<b>14</b>	10.0	10.0	9.0	7.0	46.0	43.0	27.6	<b>28.8</b>

VAS: visual analogue score for pain in millimeters; PRI: pain rating index from the McGill Pain Questionnaire.

## 5. DISCUSSÃO

Como discorrido anteriormente, a fisiopatologia da lesão medular é uma entidade complexa e dinâmica, na qual seus vários processos concorrem e interagem entre si. Estratégias de reparo necessitam de atuação em múltiplos pontos, como a redução de edema e da liberação de radicais livres, proteção de tecido neural susceptível a dano por lesão secundária pelo aumento de glutamato, estratégias de remielinização e modulação da cicatriz glial (HULSEBOSCH, 2002). Obviamente uma única estratégia terapêutica não será capaz de atuar em todas estas frentes.

A reconstrução das conexões neuronais mesmo em pequena escala pode ser suficiente para modificar a evolução clínica do paciente com lesão medular. Demonstrou-se em experimento com ratos, que uma pequena quantidade de axônios funcionais, cerca de 10%, podem ser suficientes para promover a movimentação de membros (BLIGH, 1983). Por outro lado, observou-se em pacientes com lesão medular que pequenas melhoras no quadro neurológico tem um grande impacto na qualidade de vida: o movimento das mãos em pacientes tetraplégicos tem um impacto extremo na independência destes pacientes, por exemplo. A melhora da função sexual foi descrita como a mais importante para pacientes paraplégicos, principalmente do sexo feminino; enquanto a melhora dos distúrbios esfinterianos são importantes para ambos os grupos paraplégicos e tetraplégicos (ANDERSON, 2004). Como exemplo relevante uma dos pacientes tratadas pelo protocolo de estudo descrito nesta tese, após período de acompanhamento, evoluindo com melhora expressiva de sensibilidade incluindo a genital, engravidou e apresentou gestação e parto sem intercorrências.

Embora tenha ocorrido no Brasil dois estudos prévios utilizando terapia celular para tratamento de lesão medular (CRISTANTE *et al*, 2009; CALLERA & NASCIMENTO, 2006), o presente estudo é pioneiro no uso células mesenquimais para esta patologia em nosso país. O estudo aqui relatado, por ter sido o primeiro a utilizar células mesenquimais para tratamento da lesão raquimedular, foi submetido a uma apreciação da CONEP que se estendeu em comunicações e relatórios por 2 anos até a sua aprovação. Durante este período, foi realizada a montagem de laboratório no Hospital São Rafael para a realização do cultivo celular em sala asséptica, sendo este atestado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para uso em humanos.

Inicialmente, tivemos intercorrências na instalação do sistema de refrigeração da sala de cultivo, o que levou a atraso no início das coletas de medula óssea. Ocorreram

perdas de amostras devido à instalação e regulagens deficientes das estufas de crescimento, sendo novas amostras tiveram de ser colhidas após a retificação dos sistemas inoperantes.

Em comparação aos estudos clínicos descritos na revisão de literatura, observam-se variações no tipo celular utilizado, forma de administração e concentração. Devido à falta de uniformidade, os resultados obtidos entre os diversos grupos de pesquisa foram variados e até conflitantes. A maioria dos artigos revisados realizou procedimentos de terapia celular em pacientes com lesão completa e incompleta, nosso estudo foi realizado apenas com pacientes com lesão completa, visando um aumento de segurança para os pacientes tratados. Além das variações descritas, os sistemas e exames para avaliações utilizados tiveram sua variação entre os artigos analisados, embora o uso do SSEP e da ressonância nuclear magnética tenham sido comuns a maioria dos artigos. A avaliação pré-operatória e de seguimento pela escala ASIA foi um consenso na maioria dos artigos, embora um autor discorra sobre sua eficácia como método de avaliação para pacientes tratados com terapia celular (FROLOV & BRYUKHOVETSKIY, 2012).

Os resultados do trabalho descrito nesta tese em relação à evolução neurológica são próximos aos encontrados em outros trabalhos realizados com lesão medular em fase crônica e subaguda. Observamos alterações na escala ASIA em 7 dos 14 pacientes tratados pelo nosso estudo. O artigo descrito por Lima em 2010 descreve modificações na escala ASIA em 11 pacientes de um grupo de 20 tratados (LIMA *et al*, 2010). Kishk relata alterações no ASIA em 12 pacientes de 20 tratados (KISHK *et al*, 2010). Sledtsova descreve melhora clínica em 49% dos pacientes tratados com células neurogênicas fetais em um período de observação de 3 anos (SLEDTSOVA *et al*, 2010). Karamouzian descreve resultado de 45% de alteração na escala ASIA em pacientes com lesão medular completa, pacientes apresentavam lesão subaguda, o grupo controle não tratado teve resultado de 15% de evolução espontânea (KARAMOUZIAN *et al*, 2012). Liu descreve melhora clínica em 13 de 22 pacientes tratados, embora a totalidade dos pacientes que apresentaram modificações na escala ASIA foram classificados como lesão parcial previamente ao transplante (LIU *et al*, 2012). Jiang descreve 75% de melhora clínica nos pacientes tratados com lesões completas e incompletas, sendo que todos os pacientes com lesão incompleta tiveram resultado positivo embora não tenha usado a avaliação ASIA como parâmetro (JIANG *et al*, 2013). Dai descreve estudos com pacientes com lesão medular cervical completa utilizando CMMO, com resultado de 50% no grupo de pacientes tratados utilizando a escala ASIA como referência (DAI *et al*, 2013). Como comparação, o estudo descrito nesta tese foi realizado apenas com pacientes classificados como lesão

medular completa o que nos leva a um viés nesta comparação.

Durante o acompanhamento dos pacientes tratados em nosso estudo, observamos no exame de urodinâmica o aumento na capacidade máxima vesical de ao menos 30% em 5 pacientes; 6 pacientes tiveram melhora da sensibilidade vesical. A avaliação pré-operatória evidenciou hiperreflexia de detrusor em 10 pacientes e, após o procedimento, 4 pacientes apresentaram aumento do volume de enchimento. Ao final do estudo, contudo, todos os pacientes ainda necessitavam de cateterismo de alívio.

Geffner descreve melhora da função vesical em 7 de 8 pacientes com lesões medulares agudas e crônicas. Na impossibilidade de utilização de urodinâmica, o autor descreve escala própria de função vesical (uma escala sem padrões quantitativos) (GEFFNER *et al*, 2008). Lima descreve que, em 15 pacientes sem sensibilidade prévia vesical, 5 pacientes cursaram com sensação de plenitude vesical e um paciente evoluiu com retorno completo de sensibilidade e controle vesicais apresentando ENMG positiva para controle voluntário de esfíncter vesical (LIMA *et al*, 2010). Pal descreve, em uma série de 20 pacientes, melhora da função vesical em três deles, sendo que em dois pacientes foi descontinuado o cateterismo vesical durante o acompanhamento. Como avaliação vesical, os autores empregaram apenas questionário de qualidade de vida; não foi utilizado estudo urodinâmico nesta série (PAL *et al*, 2009).

Jiang relata melhora de 80% em 10 pacientes com distúrbio vesical na descrição do seu estudo, dois pacientes com retorno completo da função vesical, utilizado a Escala de Barthel para reabilitação neurológica, como método e avaliação vesical. Não foi realizado estudo urodinâmico (JIANG *et al*, 2013).

Os pacientes selecionados em nosso estudo foram avaliados durante o pré-operatório por potencial evocado somato-sensitivo (SSEP), em nenhum paciente foi observado a presença de potenciais ação no exame inicial prévio ao procedimento. Realizado novos exames comparativos durante o seguimento 3 meses e 6 meses após transplante. Em um paciente do nosso estudo, na avaliação em 3 meses, observou-se a presença de potencial de baixa amplitude, consistente com resposta em P37/N45 no lado esquerdo que se manteve estável até o final do seguimento, observamos esta análise na figura 6.

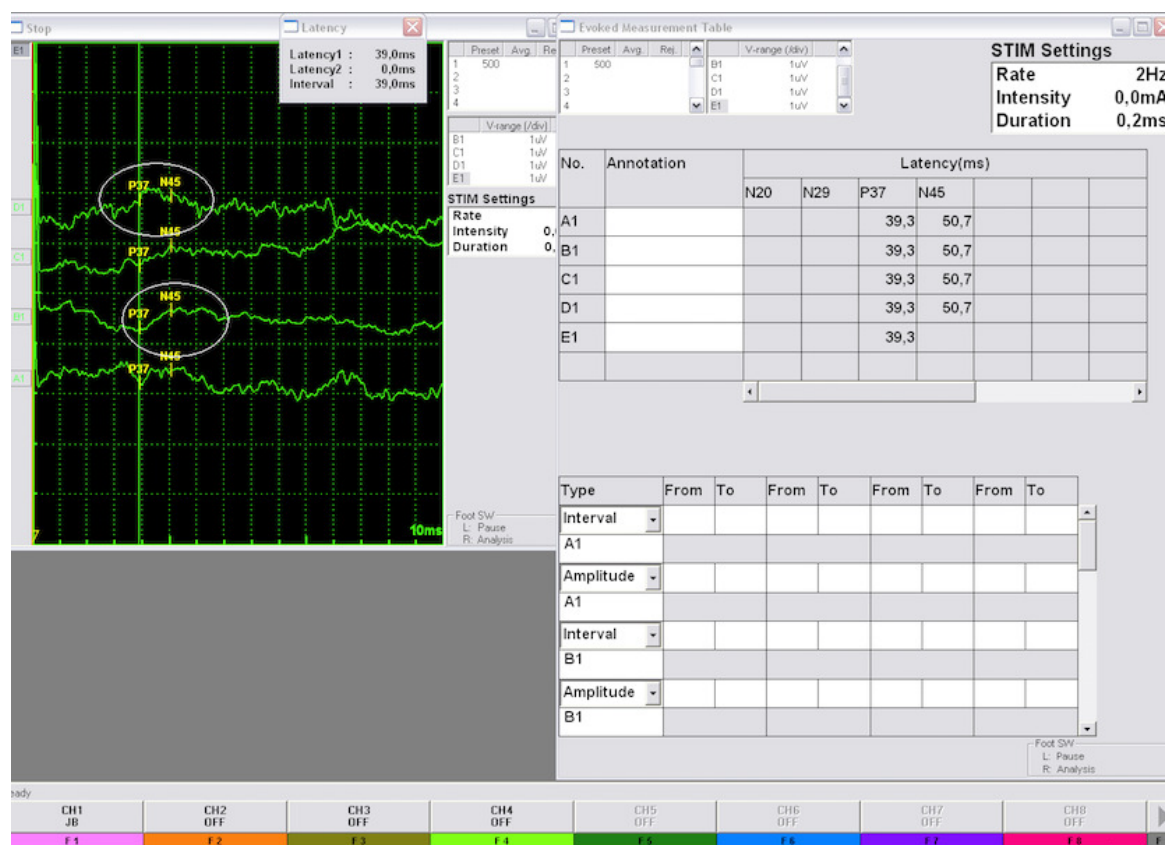


Figura 6: Potencial de ação positivo após 3 meses de transplante avaliado por SSEP

Estudos demonstram o aparecimento de onda ao exame de SSEP entre 9 a 18 meses após terapia celular, o nosso tempo de acompanhamento foi de 6 meses. A literatura demonstra que não há correlação entre a presença de SSEP e a evolução de parâmetros clínicos após terapia celular (FROLOV & BRYUKHOVETSKIY, 2012; CRISTANTE *et al*, 2009). Cristante relatou a positivação do SSEP em 26 pacientes de uma série de 39 pacientes com lesão medular crônica cervical e torácica, com início da positivação do SSEP após 9 meses do transplante (CRISTANTE *et al*, 2009). Este trabalho teve como crítica a não aderência do autor às diretrizes internacionais do uso do SSEP em pesquisas clínicas e à falta de lógica e análise relacionadas à identificação das respostas corticais (STOKI & CURT, 2010).

Lima observou a presença de potenciais sensitivos em 4 pacientes de uma série de 20 pacientes. Knoller descreve SSEP positivo em dois pacientes de sua série de 5 pacientes tratados com transplante de macrófagos ativados (KNOLLER *et al*, 2005). Deda relata melhora ao SSEP em todos os pacientes tratados em sua série; em dois pacientes, observou-se a presença de onda no pré-operatório, após procedimento os pacientes que não apresentavam potenciais de ação ao exame prévio passaram a apresentar enquanto os

pacientes com potenciais de ação presentes no exame prévio evoluíram com ondas de caráter mais estável (DEDA *et al*, 2008).

Huang descreve que, de uma série total de 108 pacientes, 31 foram acompanhados com Potencial Evocado Sensitivo Paravertebral (PVSEP) e ENMG e foram observadas melhoras no ENMG em 29 pacientes e no PVSEP em 28 pacientes (HUANG *et al*, 2012). Em estudo clínico realizado por Park em 10 pacientes com lesão medular aguda, observou-se melhora nos exames neurofisiológicos em três pacientes que tiveram melhora clínica e em dois pacientes que não modificaram o quadro neurológico prévio (PARK *et al*, 2010).

A maior parte dos estudos clínicos revisados realizaram procedimento de transplante celular em pacientes com perfil heterogêneo, apresentando lesão medular completa e lesão medular incompleta, alguns autores relataram não ter resultados clínicos em pacientes com lesão completa (LIU *et al*, 2013), outros autores definiram melhores resultados em pacientes com lesão incompleta (JIANG *et al*, 2013). Dois estudos revisados tiveram um perfil muito próximo ao estudo discutido nesta tese, realizando injeções de CMMO em pacientes com lesão medular completa na fase crônica da lesão. Bhanot realizou uma primeira injeção intralésional seguida de uma injeção intratecal após uma semana e uma segunda injeção após duas semanas do procedimento inicial, os resultados clínicos deste estudos foram limitados, apenas um paciente de 13 tratados modificou sua graduação na escala ASIA (BHANOT *et al*, 2011). Estudo chinês tratou pacientes com lesão medular através de injeção única de CMMO com melhora clínica de 50% dos pacientes tratados, sendo que estes pacientes modificaram sua classificação de ASIA A para ASIA B (DAI *et al*, 2013) enquanto em nosso estudo um paciente com lesão completa modificou sua classificação de ASIA A para ASIA C. Um dos diferenciais que explicam o resultado do nosso estudo seria a dosagem de células injetadas (em média  $2 \times 10^7$ ) e o fato deste ter sido o único estudo clínico em que a dosagem de células foi proporcional a área de lesão medular.

Observamos na tabela 1 a comparação direta entre o perfil e os resultados do experimento descrito nesta tese e outros estudos revisados na literatura em relação ao perfil de pacientes, tipo celular utilizado, as rotas de administração, resultados clínicos, resultados em testes funcionais.



**Tabela 1 – Comparação dos estudos clínicos utilizando células-tronco para o tratamento do trauma raquimedular.**

<b>Estudos (autores)</b>	<b>Cristante AF et al</b>	<b>Kishik N et al</b>	<b>Lima C et al</b>	<b>Park Y et al</b>	<b>Bhanot et al</b>	<b>Dai G et al</b>	<b>Mendonça M et al</b>
<b>Ano da publicação</b>	2009	2010	2010	2010	2011	2013	2014
<b>No. de pacientes tratados</b>	39	44	20	10	13	20	14
<b>Tipo de lesão medular prévia</b>	CO + IN	CO + IN	CO + IN	CO + IN	CO	CO	CO
<b>Presença de grupo controle</b>	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não
<b>Tipo celular utilizado</b>	CTH	CMMO	CTBO	CMMO	CMMO	CMMO	CMMO
<b>Rota de transplante</b>	AR	IT	IL	IL	IT/IL	IL	IL
<b>Modificações pós-operatórias (escala ASIA)*</b>	00	12	11	0	1	09	07
<b>Alterações no SSEP/PVSEP*</b>	23	03	04	03	00	09	01
<b>Seguimento (meses)</b>	36	12	12	30	03	06	06

CO: lesão completa; IN: lesão incompleta; CTH: células-tronco hematogênicas; CTBO: células-tronco de bainha olfatória; AR: via arterial; IT: via intratecal; IL: via intralesional.

O efeito adverso mais comum encontrado no nosso estudo foi dor transitória em região cirúrgica. Todos os pacientes tiveram alta hospitalar dentro de 48 horas após o transplante. Houve alteração do nível sensitivo de T7 para T5 em um paciente, contudo, após 2 meses a sensibilidade retornou ao nível prévio. Observamos um aumento transitório de espasticidade em 2 pacientes.

As complicações mais comuns relatadas na literatura são cefaléia e febre transitória. O quadro de cefaléia é mais comum quando se utiliza a via intratecal como rota de administração. O início ou aumento de dor neuropática também é descrito, sendo sua abrangência relatada em algumas séries a 50% dos pacientes tratados com terapia celular (KISHK *et al*, 2010). Em nosso estudo observamos a piora da dor neuropática em 3 pacientes durante o período pós-operatório imediato, durante o período de seguimento após três meses, observamos regressão de dor neuropática a níveis menores que observados no pré-operatório com redução do uso de medicação analgésica por estes pacientes. Quatro pacientes tiveram redução expressiva de dor neuropática prévia ao procedimento de transplante. A avaliação de dor foi realizada através das escalas VASe PRI, observado redução da experiência dolorosa em 67% dos pacientes avaliados.

Duas graves complicações relacionadas a processos inflamatórios foram descritas nas séries revisadas. Descrito quadro de meningite asséptica em paciente transplantado com enxerto de mucosa olfatória, levando a uma piora de quadro neurológico; após aquiescência do processo, paciente retornou a gradação prévia na escala ASIA, porém com novo déficit sensitivo permanente (LIMA *et al*, 2010). Em estudo realizado através da introdução de CMMO por via intratecal em múltiplas injeções, foi relatado quadro de obnubilação por seis horas após a terceira injeção; realizada tomografia de crânio, que evidenciou hipodensidade temporal bilateral e cerebelar sugerindo quadro de encefalite. A paciente tinha o diagnóstico prévio de mielite transversa (KISHK *et al*, 2010).

Não foi observado, em nenhum dos estudos revisados, o aparecimento de lesões neoplásicas ou alterações estruturais importantes em medula espinhal. Não foram descritos óbitos relacionados ao procedimento. A análise realizada por todos os artigos revisados descreve a terapia celular para o tratamento de lesões raquimedulares como uma técnica segura, a despeito das várias formas de administração, diferentes tipos celulares e protocolos. Nossa experiência corrobora para esta conclusão. A única complicação relacionada diretamente ao procedimento cirúrgico relatado em nossa série foi o

diagnóstico de fístula liquórica pós-operatória. A literatura relata a incidência de fistula liquórica entre 3% a 15% de pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos em coluna vertebral, sendo observado um aumento da frequência de fístulas em reabordagens cirúrgicas (revisado por EPSTEIN, 2013). Praticamente todos os pacientes do nosso estudo tinham sido submetidos previamente a procedimento cirúrgico em coluna vertebral. Após procedimento cirúrgico de correção de fistula liquórica, este paciente retornou à reabilitação em 7 dias, sendo curiosamente o paciente que teve a melhor evolução neurológica em nosso estudo.

Em relação ao desenho de estudo, observamos alguns pontos a serem comentados em vista das recomendações internacionais para a publicação de estudos clínicos relacionados à lesão medular e à lesão medular associada à terapia celular. Dentro do nosso estudo não utilizamos um grupo-controle para avaliação conjunta, embora esta sido uma das recomendações citadas (TATOR, 2006). Esta dificuldade foi apresentada em todos os estudos; apesar dos possíveis benefícios para a pesquisa, como poderíamos submeter um dos pacientes a procedimento cirúrgico invasivo simulado ou a transplante com placebo (TUSZYNSKI *et al*, 2007)? Alguns estudos utilizaram grupo controle de pacientes com lesão medular que não foram submetidos a qualquer procedimento, mas seguiam em acompanhamento paralelo (KISHK *et al*, 2010). Em outra publicação, para realizar um estudo cego, descrevia-se a colocação de uma bandagem na cicatriz cirúrgica dos pacientes operados e do grupo controle antes de serem avaliados clinicamente (MACKAY-SIM *et al* 2008). Acredito que um grupo controle que não tenha sido submetido ao mesmo protocolo não traga nenhum benefício concreto ao estudo. Como os pacientes tratados no estudo descrito nesta tese apresentavam lesão medular crônica estabelecida, entendemos que a evolução natural da lesão medular seria utilizada como controle.

Entra em discussão uma outra recomendação de desenho de estudo em que as avaliações neurológicas sejam realizadas por um observador independente que não tenha vínculos com os pesquisadores principais (DOBKIN, 2010). Em nosso estudo os pacientes foram examinados durante o período de avaliação por equipe participante do projeto; em um projeto futuro, esta recomendação deverá ser seguida de forma objetiva.

Pela literatura atual, é recomendado um tempo de seguimento mínimo de 24 meses para estudos clínicos classificados como regenerativos (TATOR, 2006).

As demais recomendações foram seguidas neste estudo, como a definição do tipo celular, caracterização fenotípica, padronização da quantidade de células injetadas e descrição da via de administração (DOBKIN, 2010). A avaliação pela escala ASIA foi

utilizada na avaliação inicial e durante o período de segmento (TATOR, 2006). Para as avaliações de exames de imagem, utilizamos a ressonância nuclear magnética, e para exames funcionais, o potencial evocado (TATOR, 2006). Para participar do estudo, pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), e protocolo de estudo foi registrado no NIH (TATOR, 2006; DOBKIN, 2010).

Em análise dos resultados obtidos pelo protocolo de estudo descrito nesta tese, algumas considerações são descritas. Durante o acompanhamento clínico, foi observado que a evolução neurológica dos pacientes tratados se mantinha, em média, por 90 dias após o transplante, após este período a evolução neurológica estacionava. Praticamente não observamos ganhos neurológicos consistentes após este período. Estudos experimentais demonstram a viabilidade de células mesenquimais após transplante por três meses (MAHAMOUD *et al*, 2003), a curva de evolução clínica obtida em felinos chega a um platô após três meses de transplante (PENHA *et al*, 2012). Em um próximo protocolo, podemos avaliar a possibilidade de múltiplos transplantes com um intervalo de tempo de 90 dias. Para evitar a realização de múltiplos procedimentos cirúrgicos invasivos, podemos utilizar uma técnica minimamente invasiva, como a punção de medula espinhal guiada por tomografia computadorizada para injeções subsequentes, abordagem já utilizada com sucesso em outro estudo (JIANG *et al*, 2013).

O protocolo de fisioterapia também merece uma reavaliação. A cinesioterapia, técnica utilizada na reabilitação, seria a mais indicada para este processo específico de reabilitação? Lima descreve o uso de duas técnicas diferentes de reabilitação em sua série, discutindo sobre a diferença significativa de resultados entre as técnicas (LIMA *et al*, 2010). Observamos estudo indiano, em que Lima esteve como coautor e, apesar dos autores seguirem de forma rígida o protocolo celular e cirúrgico do trabalho português, não foi realizada uma reabilitação sistematizada levando a resultados inferiores em relação ao trabalho original de Lima (CHHABRA *et al*, 2009). Não observamos entre as séries estudadas padronizações dos procedimentos fisioterápicos e de reabilitação. A confecção de um protocolo internacional de reabilitação amplamente aceito seria uma forma de se reduzir este viés entre os estudos.

Em relação a análise estatística realizada observamos uma correlação entre o escore motor ASIA e o nível de lesão medular baixa. Observamos uma relação inversa entre o escore sensitivo *light touch* e o volume de lesão medular. Nosso trabalho foi o único dos estudos clínicos revisados que fez uma correlação entre os resultados clínicos obtidos e

características da lesão medular, sugerindo que estas características podem influenciar a eficácia da terapia celular

Uma possível explicação para a correlação entre nível medular torácico baixo e a melhora dos achados motores esta na definição do nível medular do Centro Gerador de Padrão. O Centro Gerador de Padrão (CPG) é um conjunto de interneurônios associados à substância cinzenta do H medular em determinado nível da coluna torácica, responsável pela geração do ritmo básico de alternância entre os múltiplos grupos musculares dos membros inferiores, gerando o padrão de movimento que leva ao caminhar (ROSSIGNOL & FRIGON, 2011).

Embora bem estudado em cães e gatos, nos quais o nível medular do CPG está definido, existem poucos estudos definindo a localização topográfica do CPG em humanos.

Utilizando uma técnica indireta, a estimulação eletromagnética em medula espinhal através de um gerador externo, Gerasimenko definiu, funcionalmente, o nível medular em que é gerado o padrão responsável pelo caminhar em humanos. Os níveis T11 e T12 seriam os sítios anatômicos do CPG na espécie humana (GERASIMENKO *et al*, 2010).

É importante que os mecanismos neuronais subjacentes ao CPG humano sejam compreendidos em condições normais ou patológicas para em seguida se maximizar a recuperação da locomoção em pacientes com lesão no SNC (HUBLI, 2013)

Descreve-se que a área medular associada ao CPG é rica em interneurônios associados ao corno anterior e à mobilização dos membros inferiores. Como descrito na literatura, após uma lesão medular, neurônios desconectados dos feixes ascendentes e descendentes espinhais podem realizar conexões regionais no plano transversal e manter-se viáveis (YANG *et al*, 1990). Nossa conclusão é de que a lesão medular localizada no nível topográfico do CPG tenha uma possibilidade de resultado neurológico expressivo após terapia celular, devido a um aumento da população de interneurônios associados ao mecanismo motor neste nível em particular.

Nos últimos anos, observamos um grande número de artigos experimentais em que lesões medulares são tratadas por terapia celular pelo transplante de células-tronco pluripotentes induzidas (IPSC), estas são células-tronco pluripotentes derivadas de células somáticas adultas em que foi realizada reprogramação através de vetores virais para introduzir quatro genes que codificam os fatores de transcrição: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* e *c-Myc*. As células são redefinidas a um estágio extremamente inicial do seu desenvolvimento, no qual possuíam pluripotência. As células pluripotentes teriam a capacidade de se diferenciar em células dos três folhetos germinativos: endoderma, mesoderma e ectoderma. Em

oposição, às células pluripotentes embrionárias, não são observadas questões de cunho ético ou religioso, tendo em vista que sua origem procede de células somáticas adultas podendo ser utilizado células autólogas.

A possibilidade de imunogenicidade e o desenvolvimento de teratomas após transplante de iPSC são obstáculos importantes na aplicabilidade do método em estudos clínicos. Linhagens de clones consideradas seguras estão sendo desenvolvidas, assim como formas de diferenciação não utilizando vírus como vetores também. Uma estratégia utilizada para tornar os transplantes mais seguros seria a diferenciação *in vitro* de iPSC em células-tronco neurais previamente ao transplante, dessa forma reduzindo a provável imunogenicidade e a formação de componentes neoplásicos (OKANO *et al*, 2013).

Estudos experimentais foram realizados demonstrando a capacidade de células-tronco neurais derivadas de iPSC promoverem recuperação funcional em modelo animal de lesão medular. Observou-se em um estudo a diferenciação das células transplantadas em componentes das três linhagens neurais (TSUJI *et al*, 2010). Nori teve resultados semelhantes utilizando iPSC derivado de células humanas (NORI *et al*, 2011; KOBAYASHI *et al*, 2012). Foram relatados ainda, em outros estudos, a diferenciação direta de iPSC em neurônios motores funcionais (KARUMBAYARAM *et al*, 2009) ou mesmo a diferenciação direta de fibroblastos em neurônios motores espinhais (SON *et al*, 2011).

Okano e Yamanaka, prêmio Nobel em 2012, têm a programação de estudo clínico utilizando células-tronco neurais derivadas de iPSC. Neste estudo, será criado um banco de células-tronco neurais derivadas de iPSC para tratamento de pacientes com lesão raquimedular subaguda (OKANO & YAMANAKA, 2014).

Acreditamos que, com o desenvolvimento de novas estratégias de transplante associadas à evolução da tecnologia de manipulação celular, melhores resultados poderão ser obtidos em protocolos de tratamento futuros.

## 6. CONCLUSÕES

O procedimento de transplante autólogo de CMMO para tratamento de pacientes com traumatismo raquimedular demonstrou ser seguro durante o período de acompanhamento de seis meses.

Adicionalmente, comprovou-se a eficácia do método por meio da observação clínica com alterações na escala ASIA em 7 dos 14 pacientes tratados. Encontrou-se ainda melhora nos exames funcionais com positividade do SSEP em 1 paciente e modificações na urodinâmica em 5pacientes. Diante do exposto, acredita-se que a técnica empregada tenha potencial promissor no tratamento de pacientes portadores de lesão raquimedular. No entanto, estudos futuros, com maior número de pacientes devem ser realizados para a consolidação dos referidos achados.

## 7. REFERÊNCIAS

- Ahwar VK. Intraspinal microstimulation for the recovery of function following spinal cord injury. *Prog Brain Res.* 2011;194:227-392.
- American Spine Injury Association: International Standards for Neurological Classification of SCI Revised 2002, American Spine Injury Association. 32-50,2002
- Barnabé-Heider F, Frisé J. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell.* 2008 Jul 3;3(1):16-24.
- Bhanot Y, Rao S, Ghosh D, Balaraju S, Radhika CR, Satish Kumar KV. Autologous mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury. *Br J Neurosurg.* 2011 Aug;25(4):516-22.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192, 2001.
- Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature.* 414: 118-121, 2001.
- Blesch A, Lu P, Tuszynsk MH. Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair. *Brain Res Bull.* 57: 833–838, 2002.
- Boido M, Garbossa D, Fontanella M, Ducati A, Vercelli A. Mesenchymal stem cell transplantation reduces glial cyst and improves functional outcome after spinal cord compression. *World Neurosurg.* 2014 Jan;81(1):183-90.
- Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA* 251: 45–52, 1984
- Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg.* 1993 Oct;79(4):500-7.



- Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings MG, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. *J Neurosurg*. 1998 Nov;89(5):699-706.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290(5497):1775-9.
- Bunge RP, Puckett WR, Baccera J, et al. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv. Neurol*. 1993; 59, 75–89.
- Callera F, do Nascimento RX: Delivery of autologous bone marrow precursor cells into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with spinal cord injury: a preliminary safety study. *Exp Hematol*. 2006;34(2):130–131.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5):1076-84.
- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):341-7.
- Casha S, Zygun D, McGowan MD, Bains I, Yong VW, Hurlbert RJ. Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain*. 2012 Apr;135(Pt 4):1224-36.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001 Apr;32(4):1005-11.
- Chernykh ER, Stupak VV, Muradov GM, Sizikov MY, Shevela EY, Leplina OY, et al: Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. *Bull Exp Biol Med* 143:543–547, 2007

- Chhabra HS, Lima C, Sachdeva S, Mittal A, Nigam V, Chaturvedi D, Arora M, Aggarwal A, Kapur R, Khan TA. Autologous olfactory [corrected] mucosal transplant in chronic spinal cord injury: an Indian Pilot Study. *Spinal Cord*. 2009 Dec;47(12):887-95.
- Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*. 2000 Sep 11;11(13):3001-5.
- Chvatal SA, Kim YT, Bratt-Leal AM, Lee H, Bellamkonda RV. Spatial distribution and acute anti-inflammatory effects of Methylprednisolone after sustained local delivery to the contused spinal cord. *Biomaterials*. 2008 Apr;29(12):1967-75.
- Cloward RB. The anterior approach for removal of ruptured cervical disks. *J Neurosurg* 1958;15:602.
- Cripps RA, Lee BB, Wing P, Weerts E, Mackay J, Brown D. A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository for injury prevention. *Spinal Cord*. 2011 Apr;49(4):493-501.
- Cristante AF, Barros-Filho TE, Tatsui N, Mendrone A, Caldas JG, Camargo A, et al: Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients. *Spinal Cord* 47:733–738, 2009
- Cseuz, D. A. J., Speakman, T. J. Nerve implantation in experimental paraplegia. *J Neurosurg*. 1963 Jul;20:557-63.
- da Paz AC, Beraldo PS, Almeida MC, Neves EG, Alves CM, Khan P. Traumatic injury to the spinal cord. Prevalence in Brazilian hospitals. *Paraplegia*. 1992 Sep;30(9):636-40.
- Dai G, Liu X, Zhang Z, Yang Y, Dai Y, Xu R. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. *Brain research* 1533 (2013) 73–79
- Dasari VR, Spomar DG, Cady C, Gujrati M, Rao JS, Dinh DH. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res*. 2007 Dec;32(12):2080-93.

- David S, Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Jun 15;12(7):388-99.
- Davies SJ, Silver J. Adult axon regeneration in adult CNS white matter. *Trends Neurosci* 1998; 21: 515.
- Deda H, Inci MC, Kürekçi AE, Kayihan K, Ozgün E, Ustünsoy GE, Kocabay S. Treatment of chronic spinal cord injured patients with autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: 1-year follow-up. *Cytotherapy*. 2008;10(6):565-74.
- Delayed results of transplantation of fetal neurogenic tissue in patients with consequences of spinal cord trauma. *Bull Exp Biol Med* 149:530–533, 2010
- Destunis G. The treatment of mental deficiency and encephalopathies in childhood by, means of fresh tissue and Siccacell. *Archives of Pediatrics*,1957, 74,285-290
- Devivo MJ. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord*. 2012 May;50(5):365-72.
- Dobkin BH. Recommendations for publishing case studies of cell transplantation for spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*. 2010 Oct;24(8):687-91.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- Donovan, P.J.; Geahart, J.The end of the beginning for pluripotent stem cells.*Nature*. 414: 92-97, 2001.
- Dryden DM, Saunders LD, Jacobs P, Schopflocher DP, Rowe BH, May LA, Yiannakoulis N, Svenson LW, Voaklander DC. Direct health care costs after traumatic spinal cord injury. *J Trauma*. 2005 Aug;59(2):443-9.

- Dubois AM, Gonet A. [Regeneration of the islands of Langerhans during the course of correction of experimental diabetes in the rat by embryonic pancreatic grafting]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1961;53:481-91.
- Ducker TB, Hamit HF. Experimental treatments of acute spinal cord injury. *J. Neurosurg.* 30, 1969: 393-397.
- Er U, Naderi S. Paulus aegineta: review of spine-related chapters in "Epitomoe medicoe libri septem". *Spine (Phila Pa 1976).* 2013 Apr 15;38(8):692-5.
- Evans M, Kaufman M: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
- Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, W Cadotte D, Harrop JS, Aarabi B, Shaffrey C, Dvorak M, Fisher C, Arnold P, Massicotte EM, Lewis S, Rampersaud R. Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PLoS One.* 2012;7(2):e32037.
- Freeman LW, Wright TW. Experimental observations of concussion and contusion of the spinal cord. *Ann Surg.* 1953 Apr;137(4):433-43.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970 3: 393-403
- Frolov A, Bryukhovetskiy AS. Effects of Hematopoietic Autologous Stem Cell Transplantation to the Chronically Injured Human Spinal Cord Evaluated by Motor and Somatosensory Evoked Potentials Methods Cell Transplantation, Vol. 21, Supplement 1, pp. S49–S55, 2012.
- Furlan JC, Sakakibara BM, Miller WC, Krassioukov AV. Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury. *Can J Neurol Sci.* 2013 Jul;40(4):456-64.
- Geffner LF, Santacruz P, Izurieta M, Flor L, Maldonado B, Auad AH, Montenegro X, Gonzalez R, Silva F: Administration of Autologous Bone Marrow Stem Cells Into Spinal Cord Injury Patients Via Multiple Routes Is Safe and Improves Their Quality

of Life: Comprehensive Case Studies Cell Transplantation, Vol. 17, pp. 1277–1293, 2008

Geisler FH, Coleman WP, Grieco G, Poonian D, Sysgen Study Group: The Sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine* 26 [Suppl 24]:S87–S98, 2001.

Guha A, Tator CH, Endrenyi L, Piper I. Decompression of the spinal cord improves recovery after acute experimental spinal cord compression injury. *Paraplegia*. 1987 Aug;25(4):324-39.

Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, et al. (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 54: 2277–2286.

Harkema S, Gerasimenko Y, Hodes J, Burdick J, Angeli C, Chen Y, Ferreira C, Willhite A, Rejc E, Grossman RG, Edgerton VR. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *Lancet*. 2011 Jun 4;377(9781):1938-47.

Harrington PR. Instrumentation in spine instability other than scoliosis. *S Afr J Surg*. 1967 Jan-Mar;5(1):7-12.

Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* (2003) 41, 369–378.

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 U S A*. 2002 Feb 19;99(4):2199-204.

Holdsworth FW, Hardy A. Early treatment of paraplegia from fractures of the thoracolumbar spine. *J Bone Joint Surg[Br]* 1953;35:540–51.

Hu SL, Luo HS, Li JT, Xia YZ, Li L, Zhang LJ, Meng H, Cui GY, Chen Z, Wu N, Lin JK, Zhu G, Feng H. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after

- transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Crit Care Med.* 2010 Nov;38(11):2181-9.
- Huang H, Xi H, Chen L, Zhang F, Liu Y. Long-term outcome of olfactory ensheathing cell therapy for patients with complete chronic spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2012;21 Suppl 1:S23-31.
- Hubli M, Dietz V. The physiological basis of neurorehabilitation--locomotor training after spinal cord injury. *J Neuroeng Rehabil.* 2013 Jan 21;10:5.
- Hughes JT: The Edwin Smith Surgical Papyrus: An analysis of the first case reports of spinal cord injuries *Paraplegia*, volume 26 pp 71,72. 1988
- Hurlbert R. J. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg* 2000; 93
- Imamura H, Tator CH. Effect of intrathecal nimodipine on spinal cord blood flow and evoked potentials in the normal or injured cord. *Spinal Cord.* 1998 Jul;36(7):497-506.
- Isele NB, Lee HS, Landshamer S, Straube A, Padovan CS, Plesnila N, Culmsee C. Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons. *Neurochem Int.* 2007 Jan;50(1):243-50.
- Jammet H, Mathe G, Pendic B, Duplan JF, Maupin B, Latarjet R, Kalic D, Schwarzenberg L, Djukic Z, Vigne J. [Study of six cases of accidental acute total irradiation]. *Rev Fr Etud Clin Biol.* 1959 Mar;4(3):210-25.
- Jiang PC, Xiong WP, Wang G, Ma C, Yao WQ, Kendell SF, Mehling BM, Yuan XH, Wu DC. A clinical trial report of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in patients with spinal cord injury. *Exp Ther Med.* 2013 Jul;6(1):140-146.
- Jing Liu, Dongmei Han, Zhidong Wang, Mei Xue, Ling Zhu, Hongmin Yan, Xiaoli Zheng, Zikuan Guo & Hengxiang Wang: Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2013; 15: 185-191
- Jones LA, Lammertse DP, Charlifue SB, Kirshblum SC, Apple DF, Ragnarsson KT, et al: A

phase 2 autologous cellular therapy trial in patients with acute, complete spinal cord injury: pragmatics, recruitment, and demographics. *Spinal Cord* 48:798–807, 2010

Jussek EG, Roscher AA. Critical review of contemporary cellulartherapy (celltherapy). *J Gerontol.* 1970 Apr;25(2):119-25.

Kang SK, Yeo JE, Kang KS, Phinney DG. Cytoplasmic extracts from adipose tissue stromal cells alleviates secondary damage by modulating apoptosis and promotes functional recovery following spinal cord injury. *Brain Pathol.* 2007 Jul;17(3):263-75. Epub 2007 Apr 23.

Karamouzian S, Nematollahi-Mahani SN, Nakhaee N, Eskandary H. Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012 Sep;114(7):935-9.

Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2005 May 11;25(19):4694-705.

King VR, Phillips JB, Hunt-Grubbe H, Brown R, Priestley JV. Characterization of non-neuronal elements within fibronectin mats implanted into the damaged adult rat spinal cord. *Biomaterials.* 2006 Jan;27(3):485-96.

Kirshblum S, Millis S, McKinley W, Tulskey D. Late neurologic recovery after traumatic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2004 Nov;85(11):1811-7.

Kishk NA, Gabr H, Hamdy S, Afifi L, Abokresha N., Mahmoud H, Wafaie A, Bilal D, 2010: Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury. *Neurorehabilitation Neural Repair,* 2010; 24,702–708.

Kleitman N., Gomez A.M. Degenerated tracts in injured human spinal cord are a permissive substratum for neurite extension in vitro. *Soc. Neurosci.* 1993; 19: 39.

Knoller N, Auerbach G, Fulga V, Zelig G, Attias J, Bakimer R, et al: Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury:

phase I study results. *J Neurosurg Spine* 3:173–181, 2005.

Kobayashi Y, Okada Y, Itakura G, Iwai H, Nishimura S, Yasuda A, Nori S, Hikishima K, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS One*. 2012;7(12):e52787.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10711-6.

Krueger H, Noonan VK, Trenaman LM, Joshi P, Rivers CS. The economic burden of traumatic spinal cord injury in Canada. *Chronic Dis Inj Can*. 2013 Jun;33(3):113-22.

Kumamaru H, Saiwai H, Kubota K, Kobayakawa K, Yokota K, Ohkawa Y, Shiba K, Iwamoto Y, Okada S. Therapeutic activities of engrafted neural stem/precursor cells are not dormant in the chronically injured spinal cord. *Stem Cells*. 2013 Aug;31(8):1535-47.

Kumar AA, Kumar SR, Narayanan R, Arul K, Baskaran M: Autologous bone marrow derived mononuclear cell therapy for spinal cord injury: a phase I/II clinical safety and primary efficacy data. *Exp Clin Transplant* 7:241–248, 2009

Leal-Filho MB. Spinal cord injury: From inflammation to glial scar. *Surg Neurol Int*. 2011;2:112.

Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40(6):1275-84, 2004.

Lee KH, Suh-Kim H, Choi JS, Jeun SS, Kim EJ, Kim SS, Yoon DH, Lee BH. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2007;67(1):13-22.



- Li Y, Walker CL, Zhang YP, Shields CB, Xu XM. Surgical decompression in acute spinal cord injury: A review of clinical evidence, animal model studies, and potential future directions of investigation. *Front Biol (Beijing)*. 2014 Feb 1;9(2):127-136.
- Liang J, Zhang H, Wang D, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Sun L. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease. *Gut*. 2012 Mar;61(3):468-9.
- Lima C, Escada P, Pratas-Vital J, Branco C, Arcangeli CA, Lazzeri G, Maia CA, Capucho C, Hasse-Ferreira A, Peduzzi JD. Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*. 2010 Jan;24(1):10-22.
- Lister J. On the Antiseptic Principle in the Practice of Surgery. *Br Med J*. 1867 Sep 21;2(351):246-8.
- Lister J. On the Antiseptic Principle in the Practice of Surgery. *Br Med J*. 1867 Sep 21;2(351):246-8.
- Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2007 Jan;203(1):8-21.
- Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2007 Jan;203(1):8-21.
- Mackay-Sim A, Féron F, Cochrane J, Bassingthwaite L, Bayliss C, Davies W, Fronck P, Gray C, Kerr G, Licina P, Nowitzke A, Perry C, Silburn PA, Urquhart S, Geraghty T: Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. *Brain*. 2008 Sep;131(Pt 9):2376-86.
- Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*. 2003 Sep;53(3):697-702; discussion 702-3.
- Marketos SG, Skiadas P. Hippocrates. The father of spine surgery. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999 Jul 1;24(13):1381-7.

- Marketos SG, Skiadas PK. Galen: a pioneer of spine research. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999 Nov 15;24(22):2358-62. P
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1410-2.
- Mehta T, Feroz A, Thakkar U, Vanikar A, Shah V, Trivedi H: Subarachnoid placement of stem cells in neurological disorders. *Transplant Proc* 40:1145–1147, 2008
- Mothe AJ, Tator CH. Transplanted neural stem/progenitor cells generate myelinating oligodendrocytes and Schwann cells in spinal cord demyelination and dysmyelination. *Exp Neurol*. 2008 Sep;213(1):176-90.
- Munce SE, Wodchis WP, Guilcher SJ, Couris CM, Verrier M, Fung K, Craven BC, Jaglal SB. Direct costs of adult traumatic spinal cord injury in Ontario. *Spinal Cord*. 2013 Jan;51(1):64-9.
- Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma*. 2004 Apr;21(4):429-40.
- Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 4;108(40):16825-30.
- NSCI Spinal Cor Injury Facts and Figures at a Glance 2012 <https://www.nscisc.uab.edu>
- Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, Chou H, Ishikawa N, Matsumoto N, Iwashita Y, Mizuta E, Kuno S, Ide C. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol*. 2004 Jun;187(2):266-78.
- Okano H. Regenerative medicine of central and peripheral nervous system. *Rinsho Shinkeigaku*. 2013;53(11):1124.

- Okano H, Yamanaka S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain*. 2014 Mar 31;7:22.
- Pal R, Venkataramana NK, Bansal A, Balaraju S, Jan M, Chandra R, et al: Ex vivo-expanded autologous bone marrow derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. *Cytotherapy* 11:897–911,2009
- Pappa KI, Anagnostou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med*. 2009 May;4(3):423-33.
- Park HC, Shim YS, Ha Y, Yoon SH, Park SR, Choi BH, Park HS. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Tissue Eng*. 2005 May-Jun;11(5-6):913-22.
- Park JH, Kim DY, Sung IY, Choi GH, Jeon MH, Kim KK, Jeon SR. Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery*. 2012 May;70(5):1238-47; discussion 1247.
- Parr AM, Kulbatski I, Zahir T, Wang X, Yue C, Keating A, Tator CH. Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. *Neuroscience*. 2008 Aug 26;155(3):760-70.
- Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Oct;40(7):609-19.
- Pearse DD, Sanchez AR, Pereira FC, Andrade CM, Puzis R, Pressman Y, Golden K, Kitay BM, Blits B, Wood PM, Bunge MB. Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia*. 2007 Jul;55(9):976-1000.
- Penha EM, Aguiar PH, Barrouin-Melo SM, de Lima RS, da Silveira AC, Otelto AR, Pinheiro CM, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Clinical neurofunctional rehabilitation of a cat with spinal cord injury after hemilaminectomy and autologous stem cell transplantation. *Int J Stem Cells*. 2012 Nov;5(2):146-50.

- Penha EM, Meira CS, Guimarães ET, Mendonça MV, Gravely FA, Pinheiro CM, Pinheiro TM, Barrouin-Melo SM, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. *Stem Cells Int.* 2014;2014:437521.
- Pittinger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284:143–147.
- Rahimi-Movaghar V, Sayyah MK, Akbari H, Khorramirouz R, Rasouli MR, Moradi-Lakeh M, Shokraneh F, Vaccaro AR. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries: a systematic review. *Neuroepidemiology.* 2013;41(2):65-85.
- Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci.* 1998 May 15;18(10):3803-15.
- Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M. Implantation of stimulate homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):814-21.
- Rivlin AS, Tator CH. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *J Neurosurg.* 1978;49(6):844-53.
- Robinson RA, Smith G. Anterolateral cervical disc removal and interbody fusion for cervical disc syndrome. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1955;96:223.
- Ryu HH, Lim JH, Byeon YE, Park JR, Seo MS, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J Vet Sci.* 2009 Dec;10(4):273-84.

- Saberi H, Moshayedi P, Aghayan HR, Arjmand B, Hosseini SK, Emami-Razavi SH, Rahimi-Movaghar V, Raza M, Firouzi M. Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: an interim report on safety considerations and possible outcomes. *Neurosci Lett*. 2008 Sep 26;443(1):46-50.
- Santos RR, Soares MB, de Carvalho AC. [Bone marrow cells transplant in the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004 Nov-Dec;37(6):490-5.
- Sasaki M, Radtke C, Tan AM, Zhao P, Hamada H, Houkin K, Honmou O, Kocsis JD. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2009 Nov 25;29(47):14932-41.
- Schlesinger EB. Alfred Reginald Allen: the mythic career of a gifted neuroscientist. *Surg Neurol*. 1991 Sep;36(3):229-33.
- Seledtsova GV, Rabinovich SS, Belogorodtsev SN, Parlyuk OV, Seledtsov VI, Kozlov VA. Delayed results of transplantation of fetal neurogenic tissue in patients with consequences of spinal cord trauma. *Bull Exp Biol Med*. 2010 Oct;149(4):530-3.
- Shapiro S, Borgens R, Pascuzzi R, Roos K, Groff M, Purvines S, Rodgers RB, Hagy S, Nelson P. Oscillating field stimulation for complete spinal cord injury in humans: a phase 1 trial. *J Neurosurg Spine*. 2005 Jan;2(1):3-10. Erratum in: *J Neurosurg Spine*. 2008 Jun;8(6):604.
- Shapiro S. A review of oscillating field stimulation to treat human spinal cord injury. *World Neurosurg*. 2014 May-Jun;81(5-6):830-5. doi: 10.1016/j.wneu.2012.11.039. Epub 2012 Nov 14.
- Sharp J, Frame J, Siegenthaler M, Nistor G, Keirstead HS. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after cervical spinal cord injury. *Stem Cells*. 2010 Jan;28(1):152-63.

- Simard JM, Tsymbalyuk O, Keledjian K, Ivanov A, Ivanova S, Gerzanich V. Comparative effects of glibenclamide and riluzole in a rat model of severe cervical spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2012 Jan;233(1):566-74.
- Syková E, Homola A, Mazanec R, Lachmann H, Konrádová SL, Kobylka P, et al: Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant* 15:675–687, 2006
- Tadie M, Gaviria M, Mathe J-F, Menthonnex P, Loubert G, Lagarrigue J, Saint-Marc C, Argenson C, Kempf C, D'Arbigny P, Kamenka JM, Privat A, Carli P: Early care and treatment with a neuroprotective drug, gacyclidine, in patients with acute spinal cord injury. *Rachis* 15:363–376, 2003.
- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*. 2007;2(12):3081-9.
- Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg*. 1997 Mar;86(3):483-92.
- Tator CH. Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery*. 2006 Nov;59(5):957-82; discussion 982-7.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. Erratum in: *Science* 1998 Dec 4;282(5395):1827.
- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. *Radiat Res*. 2012 Aug;178(2):AV3-7.
- Tomasula, JJ, DeCrescito V, Goodkin R. A survey of the management of experimental spinal cord trauma. *Proc. Annu. Clin. Spinal Cord Inj. Conf*. 1969 71,12-16
- Tuono V. Traumas de Coluna no Brasil. Análise das Internações Hospitalares. Tese de Mestrado Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública, 2008.
- Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y,

- Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 13;107(28):12704-9.
- Tuszynski MH, Steeves JD, Fawcett JW, Lammertse D, Kalichman M, Rask C, Curt A, Ditunno JF, Fehlings MG, Guest JD, Ellaway PH, Kleitman N, Bartlett PF, Blight AR, Dietz V, Dobkin BH, Grossman R, Privat A; International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP Panel: clinical trial inclusion/exclusion criteria and ethics. *Spinal Cord*. 2007 Mar;45(3):222-31
- Vaccaro AR, Daugherty RJ, Sheehan TP, Dante SJ, Cotler JM, Balderston RA, Herbison GJ, Northrup BE. Neurologic outcome of early versus late surgery for cervical spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1997 Nov 15;22(22):2609-13.
- Vaquero J, Zurita M, Oya S, Santos M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosci Lett*. 2006 May 1;398(1-2):129-34.
- Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004 Mar 5;116(5):639-48.
- Wang X, Luo E, Li Y, Hu J. Schwann-like mesenchymal stem cells within vein graft facilitate facial nerve regeneration and remyelination. *Brain Res*. 2011 Apr 6;1383:71-80.
- Yang CC, Shih YH, Ko MH, Hsu SY, Cheng H, Fu YS. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS One*. 2008;3(10):e3336. d
- Yazdani SO, Hafizi M, Zali AR, Atashi A, Ashrafi F, Seddighi AS, Soleimani M. Safety and possible outcome assessment of autologous Schwann cell and bone marrow mesenchymal stromal cell co-transplantation for treatment of patients with chronic spinal cord injury. *Cytotherapy*. 2013 Jul;15(7):782-91.
- Yeo JD, Payne W, Hinwood B, Kidman AD. The experimental contusion injury of the spinal cord in sheep. *Paraplegia*. 1975;12(4):279-98.

- Yeo JD. A review of experimental research in spinal cord injury. *Paraplegia*. 1976 May;14(1):1-11.
- Yoon SH, Shim YS, Park YH, Chung JK, Nam JH, Kim MO, Park HC, Park SR, Min BH, Kim EY, Choi BH, Park H, Ha Y. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):2066-73.
- Young W, Flamm ES, Demopoulos HB, Tomasula JJ, DeCrescito V. Effect of naloxene on posttraumatic ischemia in experimental spinal contusion. *J Neurosurg*. 1981;55(2):209-19.
- Zeng X, Zeng YS, Ma YH, Lu LY, Du BL, Zhang W, Li Y, Chan WY. Bone marrow mesenchymal stem cells in a three-dimensional gelatin sponge scaffold attenuate inflammation, promote angiogenesis, and reduce cavity formation in experimental spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2011;20(11-12):1881-99.
- Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Wu YP, Chen WS. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *Indian J Med Res*. 2012 Mar;135:287-96.
- 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 Jul 10;402(1-2):51-6.
- Zurita M, Vaquero J, Bonilla C, Santos M, De Haro J, Oya S, Aguayo C. Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation*. 2008 Sep 27;86(6):845-53.



## 8.ANEXO 1

Hindawi Publishing Corporation  
Stem Cells International  
Volume 2014, Article ID 437521, 8 pages  
<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,<sup>1,2</sup> Cássio Santana Meira,<sup>1</sup> Elisalva Teixeira Guimarães,<sup>1,3</sup>  
Marcus Vinícius Pinheiro Mendonça,<sup>4</sup> Faye Alice Gravelly,<sup>5</sup> Cláudia Maria Bahia Pinheiro,<sup>6</sup>  
Taiana Maria Bahia Pinheiro,<sup>6</sup> Stella Maria Barrouin-Melo,<sup>2</sup>  
Ricardo Ribeiro-dos-Santos,<sup>7</sup> and Milena Botelho Pereira Soares<sup>1,7</sup>

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

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

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

<sup>4</sup> Hospital Espanhol, 40140-110 Salvador, BA, Brazil

<sup>5</sup> A Arca Veterinária, 40243-045 Salvador, BA, Brazil

<sup>6</sup> Estácio-FIB, Centro Universitário Estácio da Bahia, 41770-030 Salvador, BA, Brazil

<sup>7</sup> 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 ×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 µg/mL gentamycin, and 10% fetal bovine serum (all reagents were purchased from Sigma) and cultured at the density of 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> in polystyrene plates. Cell cultures were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. 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<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>). The cells were expanded during approximately 5 to 10 passages

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

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	(-)	(-)	(-)	(-)
Propioc. Reflex	(-)	Partial gain	Partial gain	(-)	Partial gain	Partial gain	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Weight bearing	(-)	(-)	(-)	(-)	1 min	1 min	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(b)										
	Before MSC	12 mo	Before MSC	12 mo	Before MSC	12 mo	Before MSC	12 mo	Before MSC	12 mo
MFS	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	Before MSC	18 mo	Before MSC	18 mo	Before MSC	18 mo	Before MSC	18 mo	Before MSC	18 mo
Rx	0	0	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; propioc 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	Before MSC	12 months after MSC	Before MSC	12 months after MSC	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  $\beta$ -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

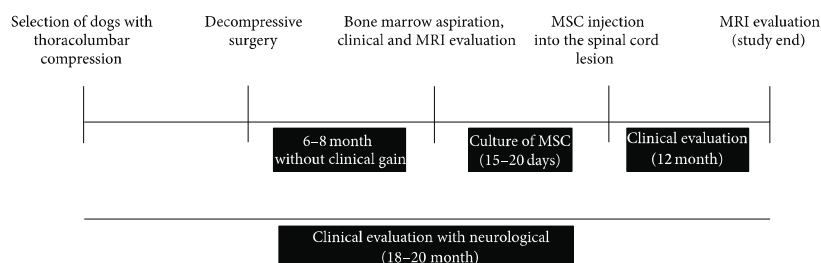


FIGURE 1: Data acquisition schematic and methods.

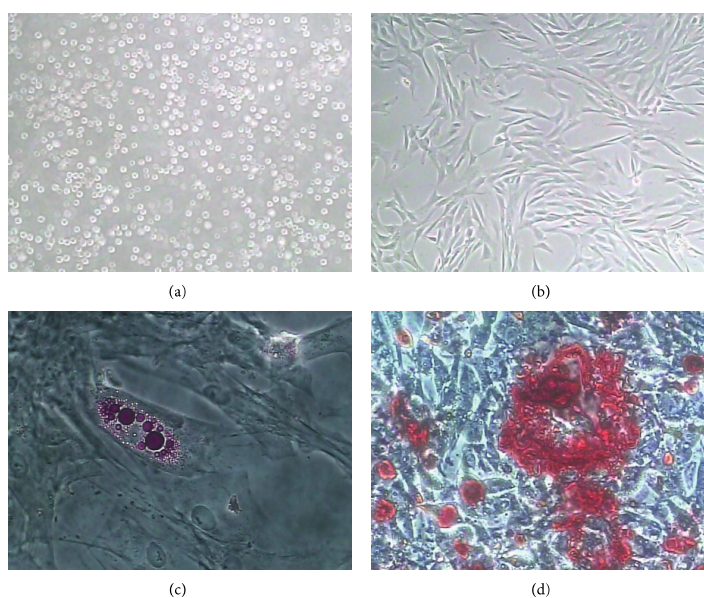


FIGURE 2: Collection, culture, differentiation, and application of dog bone marrow mesenchymal stem cells (MSC), in dog 2. (a) and (b) control cell cultures in noninducing medium. (a) Day one of a first passage culture. (b) Cell confluence after 15 days of culture. (c) Adipogenic differentiation; Oil 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

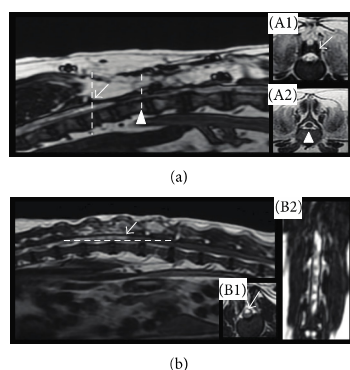


FIGURE 3: (a) MRI of a dog with syringomyelia (dog 4) showing area of hypersignal ((A1): white arrow) indicating spinal cord degeneration and an area void of spinal cord presence signal ((A2): arrow head). (b) MRI of a dog (dog 3) with a hypersignal (white arrow), indicating spinal cord degeneration 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/cm<sup>3</sup> of lesion) into the injured area. The administration of 10<sup>6</sup> cells in each 1.0 cm<sup>3</sup> 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<sup>7</sup> 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.



ANEXO 2

Patient Name \_\_\_\_\_  
 Examiner Name \_\_\_\_\_ Date/Time of Exam \_\_\_\_\_

**ASIA** AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION      **STANDARD NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY**      **ISCOS**

**MOTOR**  
KEY MUSCLES (scoring on reverse side)

C5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Elbow flexors
C6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Wrist extensors
C7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Elbow extensors
C8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Finger flexors (distal phalanx of middle finger)
T1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Finger abductors (little finger)

UPPER LIMB TOTAL (MAXIMUM)  +  =   
(25) (25) (50)

Comments: \_\_\_\_\_

L2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Hip flexors
L3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Knee extensors
L4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ankle dorsiflexors
L5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Long toe extensors
S1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ankle plantar flexors

Voluntary anal contraction (Yes/No)

LOWER LIMB TOTAL (MAXIMUM)  +  =   
(25) (25) (50)

**SENSORY**  
KEY SENSORY POINTS

C2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	LIGHT TOUCH	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	PIN PRICK	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	R	<input type="checkbox"/>	L	R	<input type="checkbox"/>	L
C4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
C5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
C6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
C7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
C8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T11	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
T12	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
L1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
L2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
L3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
L4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
L5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
S1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
S2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
S3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
S4-5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						

TOTALS: LIGHT TOUCH SCORE (max: 112)  +  =   
 PIN PRICK SCORE (max: 112)  +  =

• Key Sensory Points

NEUROLOGICAL LEVEL:  R  L  
 SENSORY MOTOR:  R  L

COMPLETE OR INCOMPLETE?  COMPLETE  INCOMPLETE  
 ASIA IMPAIRMENT SCALE

ZONE OF PARTIAL PRESERVATION:  YES  NO  
 SENSORY MOTOR:  R  L

This form may be copied freely but should not be altered without permission from the American Spinal Injury Association. REV 03/06

**MUSCLE GRADING**

- 0 total paralysis
- 1 palpable or visible contraction
- 2 active movement, full range of motion, gravity eliminated
- 3 active movement, full range of motion, against gravity
- 4 active movement, full range of motion, against gravity and provides some resistance
- 5 active movement, full range of motion, against gravity and provides normal resistance
- 5\* muscle able to exert, in examiner's judgement, sufficient resistance to be considered normal if identifiable inhibiting factors were not present

NT not testable. Patient unable to reliably exert effort or muscle unavailable for testing due to factors such as immobilization, pain on effort or contracture.

**ASIA IMPAIRMENT SCALE**

**A = Complete:** No motor or sensory function is preserved in the sacral segments S4-S5.

**B = Incomplete:** Sensory but not motor function is preserved below the neurological level and includes the sacral segments S4-S5.

**C = Incomplete:** Motor function is preserved below the neurological level, and more than half of key muscles below the neurological level have a muscle grade less than 3.

**D = Incomplete:** Motor function is preserved below the neurological level, and at least half of key muscles below the neurological level have a muscle grade of 3 or more.

**E = Normal:** Motor and sensory function are normal.

**CLINICAL SYNDROMES (OPTIONAL)**

Central Cord  
 Brown-Sequard  
 Anterior Cord  
 Conus Medullaris  
 Cauda Equina

**STEPS IN CLASSIFICATION**

The following order is recommended in determining the classification of individuals with SCI.

- Determine sensory levels for right and left sides.
- Determine motor levels for right and left sides.  
*Note: in regions where there is no myotome to test, the motor level is presumed to be the same as the sensory level.*
- Determine the single neurological level.  
*This is the lowest segment where motor and sensory function is normal on both sides, and is the most cephalad of the sensory and motor levels determined in steps 1 and 2.*
- Determine whether the injury is Complete or Incomplete (sacral sparing).  
*If voluntary anal contraction = No AND all S4-5 sensory scores = 0 AND any anal sensation = No, then injury is COMPLETE. Otherwise injury is incomplete.*
- Determine ASIA Impairment Scale (AIS) Grade:  
 Is injury Complete? If YES, AIS=A Record ZPP (For ZPP record lowest dermatome or myotome on each side with some (non-zero score) preservation)  
 NO  
 Is injury motor incomplete? If NO, AIS=B (Yes=voluntary anal contraction OR motor function more than three levels below the motor level on a given side.)  
 YES  
 Are at least half of the key muscles below the (single) neurological level graded 3 or better?  
 NO → AIS=C      YES → AIS=D

**If sensation and motor function is normal in all segments, AIS=E**  
*Note: AIS E is used in follow up testing when an individual with a documented SCI has recovered normal function. If at initial testing no deficits are found, the individual is neurologically intact; the ASIA Impairment Scale does not apply.*