

**ALEX OLIVEIRA DE ARAUJO**

**Avaliação da injeção em dose única de células-tronco obtidas do  
cordão umbilical de humanos, imediatamente e após 7 dias do  
trauma raquimedular em camundongos**

**São Paulo**

**2024**

**ALEX OLIVEIRA DE ARAUJO**

**Avaliação da injeção em dose única de células-tronco obtidas do cordão umbilical de humanos, imediatamente e após 7 dias do trauma raquimedular em camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante

**São Paulo**

**2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Araujo, Alex Oliveira de

Avaliação da injeção em dose única de células-tronco obtidas do cordão umbilical de humanos, imediatamente e após 7 dias do trauma raquimedular em camundongos / Alex Oliveira de Araujo; Alexandre Fogaça Cristante, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Células-tronco mononucleares 2. Traumatismos da medula espinal 3. Cordão umbilical 4. Atividade motora 5. Avaliação histopatológica I. Cristante, Alexandre Fogaça, orient. II. Título

USP/FM/DBD-138/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Araujo AO. Avaliação da injeção em dose única de células-tronco obtidas do cordão umbilical de humanos, imediatamente e após 7 dias do trauma raquimedular em camundongos [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Aprovado em: \_\_\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

A minha mãe **Sandra** e ao meu pai **Miguel**, por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim. Sou quem sou, em grande parte, graças a vocês e aos valores que inculcaram em mim desde o primeiro dia. Que possamos continuar a caminhar juntos, enfrentando desafios e celebrando conquistas, sempre unidos pelo laço indissolúvel do amor e da honestidade.

Às minhas irmãs **Monique** e **Luiza**, parceiras de uma vida, por cada momento compartilhado, por cada conselho sábio e por cada abraço reconfortante.

A minha esposa **Natureza**, minha companheira incansável, minha fonte de apoio, força, acolhimento e amor incondicional. Saiba que você é meu porto seguro, minha fonte de inspiração, e que meu amor por você só cresce a cada dia que passa.

A minha filha **Beatriz**, por ser a razão do meu sorriso mais sincero, por trazer cor e magia para os meus dias.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade da Pós-Graduação.

Ao **Professor Doutor Alexandre Fogaça Cristante**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela orientação e oportunidade que me concedeu de aprender e assimilar parte do seu vasto conhecimento.

Ao **Professor Doutor Raphael Martus Marcon**, Chefe do Grupo de Deformidades e Coluna Lombar do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela sua contribuição com minha formação profissional.

Ao médico ortopedista **Cícero Ricardo Gomes**, Ortopedista da Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação, membro da chefia de clínicas e coordenador do serviço de ortopedia, por todo o seu apoio durante o processo de elaboração e conclusão desta tese.

Ao médico veterinário **Gustavo Bispo dos Santos**, cujo apoio fez toda a diferença e será lembrado com profunda gratidão.

Ao estatístico **Rogério Ruscitto do Prado**, pelo contriubição na análise dos dados.

À enfermeira **Tania Fernanda Cardoso da Silva** por todo auxílio administrativo, disponibilidade e altruísmo.

Aos médicos ortopedista **Thiego Pedro Freitas Araujo e Fernando Barbosa Sanchez** por compartilharem os desafios enfrentados e colaborarem para a conclusão deste projeto.

À **Professora Doutora Maria Helena Alves Nicola**, por seu apoio no uso e manejo das células-tronco.

A todas as outras pessoas que direta ou indiretamente possibilitaram a realização desta pesquisa.

*“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir.”*

Albert Einstein

## RESUMO

Araujo AO. Avaliação da injeção em dose única de células-tronco obtidas do cordão umbilical de humanos, imediatamente e após 7 dias do trauma raquimedular em camundongos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

O traumatismo raquimedular (TRM) é considerado uma das lesões mais graves da traumatologia e pode ocasionar danos catastróficos tanto a nível individual quanto social. As causas mais frequentes de traumatismo raquimedular são os acidentes automobilísticos, as quedas de altura, os acidentes envolvendo recreação e violência. Sua fisiopatologia envolve duas fases distintas, a fase primária e a secundária, que estão diretamente correlacionadas com a gravidade da lesão. Grande parte do tratamento disponível tem efeito limitado no que diz respeito à recuperação neurológica e melhora da qualidade de vida dos pacientes. A terapia celular vem sendo estudada como uma terapia promissora para conter os efeitos deletérios da lesão neurológica após o TRM. As células-tronco são capazes de atuar na contenção do processo inflamatório e no estímulo do crescimento e regeneração do tecido nervoso, seja pela secreção de fatores neurotróficos, seja pela sua diferenciação em células neurais. Existe uma ampla variedade de células-tronco que estão sendo testadas e têm mostrado efeitos promissores. As células-tronco do sangue do cordão umbilical e placentário apresentam algumas vantagens sobre outros tipos celulares como o fato de não apresentar questões éticas relacionadas com a sua obtenção, uma vez que é retirada de um material que seria até então descartado; são células que apresentam uma menor imunogenicidade, diminuindo o risco de doença enxerto-versus-hospedeiro além disso, já foi comprovado que podem se diferenciar em células do tecido nervoso. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações histológicas e a recuperação funcional motora do tratamento na fase aguda e subaguda com células-tronco do sangue do cordão umbilical e placentário de humanos em um modelo padronizado de traumatismo raquimedular de camundongos Balb C. No total, 40 camundongos foram sorteados em 5 grupos de 8 animais, sendo os dois primeiros grupos terapêuticos e os 3 últimos grupos de controle. O grupo 1 utilizou as células-tronco imediatamente após o trauma e o grupo 2 após 7 dias do trauma. O grupo 3 recebeu soro fisiológico imediatamente após o trauma, o grupo 4 foi submetido exclusivamente ao trauma e o grupo 5 foi submetido à via de acesso e laminectomia, sem a realização do trauma raquimedular. Foi realizada avaliação motora pelas escalas BMS, MFS e plano horizontal durante 6 semanas após a lesão. Após este período, os animais foram submetidos à necropsia para avaliação macroscópica e histológica da medula. Os resultados mostraram uma melhora histológica significativa nas amostras tratadas com células-tronco, demonstrada por uma redução estatisticamente significativa nos graus de necrose, hemorragia e degeneração em comparação com os grupos de controle. Quanto à recuperação motora, observou-se uma melhora parcial de todos os grupos durante as semanas, contudo, não houve diferença estatisticamente relevante nas escalas quando comparados os grupos de



intervenção e os grupos controle. No contexto da lesão medular, o presente estudo sugere que as células-tronco mononucleares aplicadas sobre a lesão de camundongos Balb C, apresentam um papel limitado no tratamento das fases aguda e subaguda do TRM, sobretudo no que diz respeito à melhora funcional. Essas diferenças podem estar relacionadas às diferentes capacidades de diferenciação e propriedades intrínsecas desses tipos de células-tronco.

Palavras-chave: Células-tronco mononucleares. Traumatismos da medula espinal. Cordão umbilical. Atividade motora. Avaliação histopatológica.

## ABSTRACT

Araujo AO. Evaluation of single-dose injection of human umbilical cord-derived stem cells, immediately and 7 days after spinal cord injury in mice [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2024.

Spinal cord injury (SCI) stands as a critical trauma condition, potentially causing severe individual and societal repercussions. The leading causes of SCI encompass car accidents, falls from heights, recreational accidents, and acts of violence. SCI's pathophysiology comprises two distinct phases: the primary and secondary phases, directly associated with lesion severity. Present hospital care primarily aims to mitigate the harmful effects of the secondary inflammatory phase that ensues initial damage. Despite available treatments, there are limitations in terms of neurological recovery and enhancing patients' quality of life. Cell therapy, proven effective in treating some central nervous system degenerative diseases, holds promise in mitigating neurological injury's detrimental effects post-SCI. Stem cells possess the capacity to contain inflammation and stimulate nervous tissue growth and regeneration, through neurotrophic factor secretion or neural cell differentiation. A variety of stem cells are under extensive experimental evaluation, showing promising outcomes. Umbilical and placental cord blood stem cells offer advantages such as ethical acquisition, as they are obtained from otherwise discarded material, low immunogenicity, reducing graft-versus-host disease risk, and demonstrated potential to differentiate into nervous tissue cells. This study aimed to assess the histological changes and motor functional recovery following treatment in the acute and subacute phases with human umbilical cord blood and placental stem cells in a standardized model of spinal cord injury in Balb C mice. A total of 40 mice were allocated into five groups, with the first two receiving stem cells immediately after SCI and after 7 days, respectively, while the remaining three comprised control groups. Group 3 received saline solution immediately after the trauma, group 4 was exclusively subjected to the trauma, and group 5 underwent the surgical approach and laminectomy without performing the spinal cord injury. Motor assessment employed BMS, MFS, and horizontal plane scales over six weeks post-injury. Afterward, necropsy was conducted for macroscopic and histological spinal cord evaluation. Results revealed significant histological improvements in the stem cell-treated samples, manifested by a statistically notable reduction in necrosis, hemorrhage, and degeneration compared to control groups. Regarding motor recovery, all groups exhibited partial improvement over the weeks; however, there was no statistically significant difference in the scales when comparing the intervention and control groups. In the context of SCI, this study suggests that mononuclear stem cells applied directly to Balb C mice lesions have a limited role in treating the acute and subacute phases of SCI, particularly in terms of functional enhancement. These distinctions may be linked to the diverse differentiation capacities and intrinsic properties of these stem cell types.

Keywords: Mononuclear stem cells. Spinal cord injury. Umbilical cord. Motor activity. Histopathological assessment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático do kit processamento acoplado a bolsa de coleta.....	41
Figura 2 - a) Planejamento cirúrgico da incisão no dorso do camundongo; b) Laminectomia de T9 com exposição medular .....	46
Figura 3 - Impacto medular através do <i>NYU Impactor</i> .....	47
Figura 4 - Avaliação motora pós contusão medular, ilustrando a ausência de movimentação das patas traseiras e a cauda abaixada.....	49
Figura 5 - Avaliação motora do plano horizontal após lesão medular .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das escalas BMS e MFS segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações .....	55
Tabela 2 - Resultado das comparações múltiplas das escalas funcionais entre os momentos de avaliação.....	58
Tabela 3 - Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	59
Tabela 4 - Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações.....	60
Tabela 5 - Resultado das comparações múltiplas dos passos, acertos, escorregões e erros entre os momentos avaliados.....	61
Tabela 6 - Descrição dos parâmetros histológicos segundo grupos e resultado das comparações .....	62
Tabela 7 - Resultado das comparações múltiplas entre os grupos dos parâmetros histológicos que diferiram entre os grupos.....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comportamento dos grupos durante as semanas segundo a escala BMS .....	57
Gráfico 2 - Comportamento dos grupos durante as semanas segundo a escala MFS.....	57
Gráfico 3 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de necrose .....	64
Gráfico 4 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de hemorragia .....	64
Gráfico 5 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de degeneração .....	65
Gráfico 6 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de hiperemia .....	65
Gráfico 7 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de infiltrado .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	- Porcentagem
ANOVA	- Análise de variância
Anti-GFAP	- Anticorpo policlonal anti-glial fibrillary acidic protein
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASIA	- Associação Americana de Lesão Medular
BDNF	- Fator neurotrófico derivado do cérebro
BMS	- Basso Mouse Scale
C1	- Primeira vértebra cervical
C8	- Oitava vértebra cervical
CA <sup>2+</sup>	- Cálcio
CAPESP	- Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CCAC	- Canadian Council on Animal Care
CD133	- Marcador de superfície celular
CD34	- Marcador de superfície celular
CD45	- Marcador de superfície celular
CD56+	- Marcador de superfície celular
CMN	- Células mononucleares
CNS	- Conselho Nacional de Saúde
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTE	- Célula-tronco embrionária
CTM	- Célula-tronco mesenquimal
CTPi	- Célula-tronco pluripotente induzida
DMSO	- Dimetilsulfóxido
g	- Grama
GDNF	- Fator neurotrófico derivado de células gliais
GM-1	- Gangliosídeo M1
HBV	- Vírus da Hepatite B
HC-FUMSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCV	- Vírus da Hepatite C
HE	- Hematoxilina-eosina
HIV 1 e 2	- Vírus da imunodeficiência humana 1 e 2
HTLV I/II	- Vírus linfotrófico de células T humanas I e II
IFN- $\gamma$	- Interferon $\gamma$
IL-10	- Interleucina 10
IL-2	- Interleucina 2
IL-6	- Interleucina 6
IL-7	- Interleucina 7
IOT	- Instituto de Ortopedia e Traumatologia

L	- Litro
L1	- Primeira vértebra lombar
L5	- Quinta vértebra lombar
LETRAN	- Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos
MASCIS	- <i>Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study</i>
MI	- Mililitro
mm	- Milímetro
MS	- Ministério da Saúde
Na <sup>+</sup>	- Sódio
NGF	- Fator de crescimento neural
NYU-impactor	- New York University Impactor
PAM	- Pressão arterial média
PBS	- Tampão fosfato salino
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
RDC	- Resolução de diretoria colegiada
S1	- Primeira vértebra sacral
S5	- Quinta vértebra sacral
SCUP	- Sangue do cordão umbilical e placentário
SNC	- Sistema Nervoso Central
T1	- Primeira vértebra torácica
T11	- Décima primeira vértebra torácica
T12	- Décima segunda vértebra torácica
T7	- Sétima vértebra torácica
T8	- Oitava vértebra torácica
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa
TRM	- Traumatismo raquimedular
UTI	- Unidade de Terapia Intensiva
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1	FISIOPATOLOGIA DO TRAUMATISMO RAQUIMEDULAR .....	17
<b>1.1.2</b>	<b>Lesão primária</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Lesão secundária</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Fase aguda</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1.5</b>	<b>Fase subaguda</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1.6</b>	<b>Fase crônica</b> .....	<b>20</b>
1.2	QUADRO CLÍNICO .....	20
1.3	TRATAMENTO .....	21
1.4	PROGNÓSTICO E REABILITAÇÃO .....	22
1.5	TRABALHOS EXPERIMENTAIS SOBRE TRAUMATISMO RAQUIMEDULAR .....	23
1.6	TERAPIA CELULAR NO TRM .....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
3.1	TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO .....	28
<b>3.1.1</b>	<b>Fontes de células-tronco</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Células-tronco do sangue do cordão umbilical e placentário</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Composição das células-tronco do sangue do cordão umbilical</b> .....	<b>31</b>
3.2	ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM LESÕES MEDULARES .....	32
<b>3.2.1</b>	<b>Escalas de avaliação funcional em camundongos</b> .....	<b>33</b>
3.2.1.1	<i>Basso mouse scale</i> (BMS) .....	33
3.2.1.2	<i>Motor function score</i> (MFS) .....	33
3.2.1.3	Avaliação por meio da escada horizontal .....	34
<b>3.2.2</b>	<b>Estudos experimentais com células-tronco em traumatismo raquimedular</b> .....	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1	ÉTICA .....	38
4.2	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO .....	38
4.3	COLETA E ARMAZENAMENTO DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO .....	39
4.4	CRIOPRESERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS EM BIORREPOSITÓRIO .....	40
4.5	PROCESSAMENTO DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO .....	40
4.6	DESCONGELAMENTO CELULAR .....	42
<b>4.6.1</b>	<b>Preparo da solução hipertônica de descongelamento</b> .....	<b>42</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Descongelamento da unidade</b> .....	<b>42</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Diluição da amostra em criotubos</b> .....	<b>43</b>
4.7	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	44



4.8	MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR.....	45
4.8.1	<b>Protocolo de anestesia .....</b>	<b>45</b>
4.8.2	<b>Procedimento cirúrgico .....</b>	<b>45</b>
4.8.3	<b>Contusão medular e transplante celular .....</b>	<b>46</b>
4.8.4	<b>Pós-operatório .....</b>	<b>47</b>
4.8.5	<b>Analgesia.....</b>	<b>48</b>
4.8.6	<b>Antibiticoprofilaxia .....</b>	<b>48</b>
4.9	DESFECHOS ANALISADOS .....	48
4.9.1	<b>Avaliação motora.....</b>	<b>48</b>
4.9.2	<b>Avaliação histológica .....</b>	<b>50</b>
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1	ANÁLISE FUNCIONAL .....	54
5.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	62
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>85</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

O traumatismo raquimedular (TRM) é considerado uma das mais graves lesões da traumatologia e tem um impacto devastador para a sociedade, tanto na esfera individual, podendo levar a grandes perdas pessoais; quanto social, por se tratar de uma patologia com tratamento de alto custo<sup>(1-3)</sup>. O custo estimado da vida de uma pessoa de 25 anos com lesão da medula cervical alta pode superar 3 milhões de dólares, e mais de 1 milhão de dólares para uma pessoa de 25 anos com paraplegia<sup>(4)</sup>.

A incidência anual global de TRM é estimada entre 10,4 e 83 casos por milhão por ano, com uma larga variação entre as regiões e os países. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, são aproximadamente 250.000 a 500.000 casos por ano ao redor do mundo<sup>(3,5)</sup>. A coluna cervical é o segmento mais comumente afetado, seguido pelo torácico e lombar<sup>(2,6)</sup>. A prevalência relatada estimada está entre 236 e 4187 por milhão de habitantes, no entanto, esses números são muito limitados por uma falta de dados suficientes publicados da África, América do Sul e Ásia<sup>(2)</sup>.

O TRM ocorre 3 a 4 vezes mais frequentemente em homens do que mulheres. A distribuição de idade é bimodal com o primeiro e maior pico observado entre 15 e 29 anos de idade e um segundo pico ocorrendo em idades superiores a 65<sup>(2)</sup>.

As causas mais comuns de TRM são colisões de veículos motorizados, quedas, recreação e violência. Lesões por esmagamento e tentativa suicídio contribuem em menor grau, com grande variação entre as regiões globais<sup>(2)</sup>.

## 1.1 FISIOPATOLOGIA DO TRAUMATISMO RAQUIMEDULAR

O TRM pode ser entendido como uma lesão primária, seguida de uma lesão secundária, resultando em uma cascata progressiva de danos teciduais, os quais podem ser exacerbados por uma disfunção autonômica sistêmica. A supressão desse processo patológico constitui o fundamento do tratamento farmacológico e cirúrgico dessa condição<sup>(1,2,7)</sup>.

### 1.1.2 Lesão primária

A lesão primária resulta de um insulto traumático para a medula espinhal. É resultado da ação de forças compressivas sobre a medula espinhal, que levam a um dano tecidual associado a ruptura de axônios, vasos sanguíneos e membranas celulares<sup>(2)</sup>. De modo geral, existem quatro tipos de mecanismos de lesão primária: impacto acompanhado de compressão persistente; impacto isolado; distração; e laceração/transecção. Entre esses mecanismos, o impacto associado à compressão persistente é o mais prevalente e frequentemente ocorre por meio de fraturas por explosão<sup>(8)</sup>.

### 1.1.3 Lesão secundária

A lesão primária desencadeia uma cascata de eventos que marca o início da lesão secundária. Esta segunda fase da lesão é iniciada pela quebra das barreiras protetoras que normalmente mantêm o “isolamento imunológico” do sistema nervoso central (SNC)<sup>(2,9)</sup>.

A lesão secundária se inicia com algumas horas e pode durar semanas. Dentro de segundos, a lesão da microvasculatura causa hemorragia e edema que prejudica a perfusão sanguínea para a medula espinhal traumatizada. Trombose e vasoespasmos contribuem para agravar a isquemia. Ocorre necrose com ruptura mecânica das membranas celulares, o que culmina com uma liberação de glutamato que pode atingir níveis citotóxicos além da desregulação iônica do influxo de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup><sup>(2,7)</sup>.

Os mecanismos da fase inicial da lesão secundária são divididos conceitualmente em três estágios: agudo (até 48 horas), subagudo (entre 2 dias e 14 dias) e crônico (iniciando-se após 6 meses). É durante estas fases iniciais que a intervenção médica, incluindo descompressão cirúrgica precoce, administração de neuroprotetores e agentes neuroregenerativos, é estudada visando evitar um agravamento do dano tecidual<sup>(1,2,7)</sup>.

#### 1.1.4 Fase aguda

A fase aguda se apresenta principalmente com ruptura vascular, hemorragia e isquemia. Ocorre uma neuroinflamação resultante da ativação do sistema imune inato pelas citocinas liberadas pelos astrócitos, células endoteliais e micróglia<sup>(8)</sup>. A ruptura da microcirculação é acompanhada pela desregulação iônica associada com uma infiltração de neutrófilos que irão liberar a mieloperoxidase, contribuindo para a citotoxicidade, produção excessiva de radicais livres e resposta inflamatória, o que é responsável por uma agressão adicional aos neurônios e células da glia<sup>(9)</sup>. A citotoxicidade é resultado da superativação de neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato) e pode induzir um apoptose dos neurônios e das células da glia, especialmente os oligodendrócitos<sup>(7)</sup>.

Os radicais livres provocam uma peroxidação lipídica das membranas celulares, resultando na lise das células, disfunção das organelas e desequilíbrio da homeostase iônica intracelular<sup>(7)</sup>.

As células inflamatórias infiltram a área lesionada, liberando fatores de necrose tumoral, interleucinas (principalmente IL1 e IL6) e outros fatores inflamatórios, levando a necrose celular e apoptose. Estes fenômenos contribuem com a liberação de novos radicais livres que lesionam as células endoteliais e contribuem com a disfunção dos astrócitos<sup>(7,8)</sup>.

#### 1.1.5 Fase subaguda

Fase caracterizada pela proliferação de astrócitos reativos. Os astrócitos lesionados são ativados para produzir mais células reativas, contribuindo com a formação de fibrose e uma cicatriz glial mais densa. As cicatrizes gliais mais densas agem como uma barreira mecânica e química, ao secretar moléculas extracelulares inibitórias como o sulfato de condroitina, que inibem o crescimento e o desenvolvimento dos axônios<sup>(7)</sup>.

Os astrócitos também exercem uma função positiva na regeneração após o TRM. A hiperplasia astrocitária pode levar a cicatrização do tecido neurológico lesionado, recuperar a homeostasia local e contribuir com a recuperação da barreira hematoencefálica. Com a barreira reconstruída, diminui-se o edema, a infiltração de células inflamatórias e limita-se a difusão do processo inflamatório,

diminuindo o dano secundário. Além disso, os astrócitos também secretam fatores de crescimento neutrofílicos que exercem efeitos neuroprotetores, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro, fator de crescimento endotelial vascular e o fator de crescimento de fibroblastos. Estes fatores estimulam a migração, proliferação e diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos que irão prevenir a desmielinização após a lesão<sup>(7)</sup>.

#### **1.1.6 Fase crônica**

A fase crônica geralmente se inicia após 6 meses da lesão, embora isso seja controverso. Nesta fase ocorre a maturação da lesão, incluindo a formação da cicatriz e o desenvolvimento de siringomielia. Portanto o tratamento se concentra em melhorar a regeneração dos axônios danificados e da bainha de mielina e prevenir a formação das cicatrizes gliais<sup>(7)</sup>.

### **1.2 QUADRO CLÍNICO**

O TRM comumente resulta em alterações nas funções sensitivas, motoras e autonômicas. Além disso, pode induzir quadros de dor intratável e afetar as funções respiratória, urinária e gastrointestinal. Essas complicações também podem predispor os pacientes ao desenvolvimento de infecções, contribuindo para uma significativa deterioração na qualidade de vida<sup>(7)</sup>.

### 1.3 TRATAMENTO

Os cuidados primários com relação à lesão medular aguda são voltados para conter os efeitos deletérios da cascata secundária, portanto, deve-se dar ênfase na melhora da oxigenação e perfusão da medula. O atendimento inicial deve ser voltado a se evitar a hipotensão, induzir hipertensão e encaminhar o paciente para serviço especializado que realize descompressão medular e estabilização da coluna. O objetivo é manter a pressão arterial média (PAM) entre 85 mmHg e 90 mmHg pelos primeiros 7 dias após a lesão medular<sup>(2)</sup>.

O uso de corticoide ainda é um tema controverso. Existem autores que defendem que a descompressão precoce (< 24 horas) em conjunto com succinato sódico de metilprednisolona apresentam bons resultados<sup>(2)</sup>. O emprego de metilprednisolona entre os cirurgiões tem demonstrado uma redução, conforme indicado por estudos que investigaram os padrões de prática médica. Apesar disso, uma pesquisa realizada em 2018 sugeriu que a maioria dos cirurgiões em todo o mundo (52,9%) ainda faz uso de metilprednisolona no tratamento de lesões medulares agudas<sup>(8)</sup>.

Existem ainda diversas substâncias neuroprotetoras e agentes neurorregenerativos que estão sendo testados, em diferentes fases clínicas, para tentar conter os efeitos deletérios da fase secundária. São exemplos desses agentes o GM-1, Gangliosídio, nimodipina, naloxone, mesilato de tirizilade, Minociclina e Riluzole<sup>(2)</sup>.

O tratamento cirúrgico visa corrigir o efeito compressivo sobre as estruturas nervosas, restaurar o alinhamento anatômico, dar estabilidade, bem como potencializar a recuperação neurológica<sup>(2,6)</sup>. O desfecho neurológico depende da gravidade e do nível da lesão. Na prática clínica, os pacientes com lesão incompleta são tratados com mais urgência do que os pacientes com lesão completa, pois costumam apresentar melhora funcional mais evidente<sup>(6)</sup>. O tempo ideal para a intervenção cirúrgica ainda tem sido bastante discutido na literatura, com as evidências se voltando cada vez mais para a intervenção precoce<sup>(1,2)</sup>.

Os trabalhos atuais sugerem que a descompressão precoce, quando realizada em menos de 24 horas, leva a uma melhor recuperação dos pacientes vítimas de trauma raquimedular<sup>(2)</sup>. Em uma metanálise publicada em 2021, Badhiwala et al.<sup>(10)</sup> observaram benefícios da descompressão antes de 24 horas. Os autores observaram

que a realização da cirurgia descompressiva dentro de um intervalo de 24 horas após a lesão está correlacionada com uma recuperação motora e sensitiva mais eficaz, em contraste com procedimentos cirúrgicos realizados 24 horas ou mais após o evento traumático. Além disso, no caso específico de lesões na medula cervical, verificaram que a melhoria adicional nos escores motores totais associada à descompressão precoce é mais pronunciada nos membros superiores, ao nível da lesão ou imediatamente abaixo, em comparação com os membros inferiores. Também foi observado que durante o período inicial de 24 a 36 horas após a ocorrência da lesão, existe uma diminuição acentuada e constante na recuperação motora quando há atraso na realização da cirurgia descompressiva. Por último, após esse período inicial de 24 a 36 horas, a recuperação motora tendeu a se estabilizar, e a capacidade da cirurgia descompressiva ficou comprometida.

Bock et al.<sup>(1)</sup> compararam os efeitos da descompressão ultraprecoce (< 4 horas do trauma) e da descompressão precoce (entre 4 e 24 horas do trauma) numa coorte de 69 pacientes com TRM de forma retrospectiva. Os autores não observaram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à recuperação neurológica.

#### 1.4 PROGNÓSTICO E REABILITAÇÃO

As prioridades de recuperação diferem entre os pacientes com paraplegia e tetraplegia. Pacientes com paraplegia têm alta prioridade em recuperar a locomoção e a função sexual. Já os pacientes com tetraplegia, têm necessidade prioritária de ganhar função das mãos<sup>(6)</sup>.

Apenas 10% a 15% dos pacientes com uma lesão neurológica completa irão melhorar o nível para uma lesão incompleta. As taxas de recuperação de lesões incompletas são consideravelmente melhores<sup>(2)</sup>. O nível da lesão neurológica também é um fator determinante. Os pacientes vítimas de trauma cervical costumam ter uma melhora mais pronunciada do que os pacientes vítimas de trauma torácico <sup>(2)</sup>.



## 1.5 TRABALHOS EXPERIMENTAIS SOBRE TRAUMATISMO RAQUIMEDULAR

O contínuo estudo da fisiopatologia associada à lesão do sistema nervoso central tem proporcionado uma base de evidências para diversas abordagens terapêuticas. Resultados promissores têm sido observados em relação à melhora da função neurológica em pacientes com lesões medulares. A compreensão dos processos fisiopatológicos primários e secundários tem sido amplamente investigada por meio de experimentação em laboratório utilizando modelos de lesão da medula espinhal. Dentre os vários modelos avaliados, destaca-se o uso de animais como gatos, cachorros, macacos e ratos, sendo estes últimos os mais comumente empregados<sup>(11,12)</sup>. A uniformização do modelo de lesão medular viabiliza a replicabilidade e a avaliação dos desfechos<sup>(13)</sup>.

Os modelos murinos oferecem vantagens distintas em relação a outros modelos animais. Os camundongos são economicamente viáveis para os laboratórios, apresentam alta taxa reprodutiva, são de fácil manejo e requerem cuidados mínimos. Além disso, eles oferecem um vasto potencial para a engenharia genética, permitindo a realização de estudos direcionados nessa área. Essas características tornam os camundongos uma escolha preferencial como modelo experimental, oferecendo uma plataforma eficiente e acessível para pesquisas científicas<sup>(14,15)</sup>.

Considerando o exposto, com o objetivo de minimizar o impacto na qualidade de vida das pessoas afetadas por lesão medular, a investigação nesse campo continua progredindo<sup>(16,17)</sup>. Com o aumento das restrições ao uso de animais em pesquisa científica na era moderna, o modelo murino pode representar uma alternativa viável, oferecendo uma abordagem mais simples, conveniente e econômica. Isso possibilita a continuidade da investigação sobre o tema de forma eficiente.

## 1.6 TERAPIA CELULAR NO TRM

A terapia celular tem se tornado cada vez mais relevante nos estudos das doenças neurodegenerativas e do traumatismo raquimedular. A terapia com células-tronco emerge como uma das alternativas promissoras entre as opções terapêuticas disponíveis para o TRM. Os Estados Unidos e a China destacam-se como os principais líderes e contribuintes na pesquisa global nesse domínio<sup>(18,19)</sup>.

Existem diferentes tipos celulares, que podem ser obtidos de uma variedade de fontes. As células-tronco transplantadas exercem seus efeitos por meio de três mecanismos principais. O primeiro mecanismo envolve a substituição celular, no qual as células-tronco se diferenciam em células neuronais ou vasculares para compensar a função prejudicada pela lesão. Em segundo lugar, ocorre a regeneração das células-tronco, onde o transplante desencadeia a regeneração das células-tronco neuronais do próprio paciente. Por fim, há a multipotência funcional, na qual as células-tronco transplantadas liberam diversos fatores tróficos que ajudam a reduzir o dano ao sistema nervoso ou a facilitar a formação de novos circuitos neuronais<sup>(8,19)</sup>.

Embora numerosos estudos experimentais tenham avaliado o uso de células-tronco no tratamento da lesão medular, ainda existem desafios significativos. Por exemplo, a taxa de sobrevivência das células transplantadas na medula espinhal é baixa. Além disso, a fase da lesão medular em que as células-tronco podem alcançar o melhor resultado possível, permanece incerta. Ademais, ainda há muita controvérsia sobre a identificação e seleção do tipo de célula mais adequado<sup>(20)</sup>

## **2 OBJETIVO**

Avaliar as alterações histológicas e a recuperação funcional motora do tratamento na fase aguda e subaguda com células-tronco do sangue do cordão umbilical e placentário de humanos em um modelo padronizado de traumatismo raquimedular de camundongos Balb C.

## **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### 3.1 TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são definidas como células não especializadas com a capacidade de autorrenovação e de diferenciação em outras células; e podem ser encontradas nos seres humanos desde os estágios iniciais até mesmo no final da vida. (21,22).

As células-tronco têm a capacidade de proporcionar diversos efeitos terapêuticos, abrangendo desde a liberação de moléculas sinalizadoras para o ambiente circundante (efeito parácrino), a ativação de células-tronco e células progenitoras naturalmente presentes no corpo, até a promoção direta da regeneração dos tecidos nervosos, a redução da resposta inflamatória, a promoção da formação de novos vasos sanguíneos e até mesmo sua diferenciação em diferentes tipos de células<sup>(23)</sup>.

Elas podem apresentar basicamente dois tipos de divisão: simétrica e assimétrica. Quando a célula-tronco origina duas células-tronco idênticas, ocorre a divisão simétrica. Em contrapartida, quando a célula dá origem a uma célula diferenciada e uma célula-tronco idêntica, ocorre a divisão assimétrica<sup>(22)</sup>.

O repertório de células que uma célula-tronco é capaz de se maturar diz respeito à sua potência. Uma célula totipotente pode se diferenciar em qualquer população de célula terminal (o principal exemplo é o zigoto), já uma célula pluripotente, tem a capacidade de se diferenciar em quase todos os tipos celulares das três camadas germinativas (o principal exemplo são as células-tronco embrionárias). As multipotentes só são capazes de se diferenciar em linhagens específicas (as células-tronco mesenquimais são as mais conhecidas)<sup>(21,22)</sup>.

As células oligopotentes podem se diferenciar em poucos tipos celulares. A célula-tronco mieloide é um exemplo, ela pode se diferenciar nas células brancas hematológicas, mas não na linhagem vermelha. Já as células unipotentes são as mais limitadas em termos de diferenciação, podendo se diferenciar apenas no seu próprio tipo celular, mas mantendo a capacidade de autorrenovação que é necessária para se classificar como célula-tronco (principal exemplo são as células-tronco musculares)<sup>(21,24)</sup>. As células-tronco ainda podem ser divididas de acordo com a sua fonte em células embrionárias e adultas (progenitoras). A principal função das células-tronco adultas é manter e reparar os tecidos onde estão localizadas<sup>(21,22)</sup>.

As células-tronco embrionárias (CTEs) têm a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em diversas linhagens celulares<sup>(25)</sup>. A aquisição de CTEs envolve o isolamento de células da massa celular interna do blastocisto em desenvolvimento (4 a 5 dias de vida), uma das fases finais nas quais as células germinativas retêm a capacidade de pluripotência e autorrenovação; isso, no entanto, resulta na destruição do blastocisto, suscitando importantes questionamentos do ponto de vista ético. Além disso, a formação de teratomas foi observada em vários modelos animais de terapia celular derivada de CTE, sendo uma outra fonte de preocupação<sup>(21,25)</sup>.

### 3.1.1 Fontes de células-tronco

De um modo geral, as células-tronco podem ser obtidas de maneira autóloga ou alogênica de cadáveres, de doadores vivos adultos e de origem embrionária. As células de origem embrionária esbarram principalmente na questão ética, no que diz respeito aos riscos associados à sua aquisição<sup>(26)</sup>.

Dadas as controvérsias em torno das CTEs, as atenções foram se voltando mais para as células-tronco mesenquimais (CTMs) e células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi), como alternativas multipotentes às CTEs humanas. Diferentemente das CTEs, as CTMs podem ser prontamente colhidas em adultos e são obtidas de vários órgãos e tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical e cavidade oral. As CTMs são caracterizadas por marcadores de superfície e geralmente dão origem a células derivadas da mesoderme. Apesar disso, já foi demonstrado *in vitro* e *in vivo*, a diferenciação das CTMs em células do tecido neural, que são derivados da ectoderme, mostrando a sua capacidade de transdiferenciação (quando uma célula de uma camada germinativa se diferencia em uma célula de outra camada)<sup>(22)</sup>.

Além disso, a possibilidade de coletar e transplantar CTMs de forma autóloga reduz bastante as preocupações com imunogenicidade e rejeição de enxertos. Estas células ainda apresentam vantagens como a maior facilidade para as aprovações de uma perspectiva regulatória, bem como o crescimento rápido e grande viabilidade a longo prazo, com o potencial de diferenciação neuronal ou neuroglial além da secreção de fatores de crescimento<sup>(20,25,27)</sup>.

Em 2006, Takahashi e Yamanaka<sup>(28)</sup> descobriram a possibilidade de reprogramar células somáticas adultas em células-tronco pluripotentes. Através da transdução de fibroblastos de ratos, mediada por retrovírus, com quatro fatores de

transcrição (Oct-3/4, Sox2, KLF4, e c-Myc) presentes em células embrionárias, foi possível transformar esses fibroblastos em células-tronco pluripotentes. Esta nova forma de se originar células-tronco foi chamada de células-tronco pluripotentes induzidas. Estas células apresentam características semelhantes às CTEs e são uma alternativa que também tem sido utilizada nos estudos experimentais de terapia celular, porém existem relatos da formação de teratomas com o uso destas células, o que também levanta questões quanto a sua segurança, à semelhança das CTEs<sup>(24,25,29)</sup>.

As CTMs já demonstraram efeito neuroprotetor em diferentes doenças neurodegenerativas; além disso, o seu efeito imunomodulador e anti-inflamatório já foi comprovado em algumas doenças sistêmicas. No TRM, estas células podem apresentar efeitos imunomoduladores ao suprir o local da lesão tissular com variados fatores de crescimento, dentre eles o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento neural (NGF). Além disso, elas podem reduzir a apoptose e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para reduzir a resposta inflamatória que ocorre após a lesão medular<sup>(27)</sup>.

### **3.1.2 Células-tronco do sangue do cordão umbilical e placentário**

As células-tronco do sangue do cordão umbilical e placentário (SCUP) possuem características únicas que as tornam altamente vantajosas para aplicações clínicas e de pesquisa. Elas são facilmente acessíveis e podem ser armazenadas a temperaturas criogênicas por longos períodos de tempo, garantindo sua viabilidade a longo prazo. Além disso, sua obtenção é realizada de maneira não invasiva, o que significa que não apresenta riscos para o doador, pois são coletadas a partir do material que seria descartado após o nascimento do recém-nascido<sup>(30)</sup>.

É importante observar que o sangue do cordão umbilical não é a única fonte de células-tronco derivadas do cordão umbilical. Outras populações de células derivadas do cordão umbilical, como as células perivasculares do cordão umbilical, as células endoteliais da veia umbilical e as células-tronco da camada do cordão umbilical, também representam alternativas viáveis para aplicações terapêuticas e de pesquisa<sup>(30)</sup>.



Seu efeito biológico ocorre através da liberação de citocinas, fatores tróficos e moléculas de adesão de células neurais, os quais promovem reparo do tecido nervoso, incluindo crescimento axonal<sup>(27)</sup>. Muitos estudos pré-clínicos com modelo de lesão medular mostram efeitos benéficos das células-tronco do SCUP através de atividade neurotrófica, anti-inflamatória, antiapoptótica e angiogênica. Além disso, existem estudos que sugerem uma maior capacidade de proliferação das células-tronco do SCUP, se comparadas com as células-tronco da medula óssea.

As células-tronco do SCUP ainda têm como vantagem o seu baixo potencial imunogênico (apresentam um maior número de progenitores imaturos), o que diminui a chance de doença enxerto-versus-hospedeiro em transplantes alogênicos, bem como provoca menos rejeição e infecção pós enxerto<sup>(4)</sup>. Existem estudos *in vitro* e *in vivo* que mostram a capacidade destas células de se diferenciar em células das três camadas germinativas, incluindo as células neurais<sup>(19)</sup>.

As células-tronco do SCUP podem ainda produzir citocinas e fatores neurotróficos, incluindo fator de crescimento endotelial vascular, fator neurotrófico derivado da linha de células gliais e fator neurotrófico derivado do cérebro, que estimulam a regeneração nervosa, promovem o crescimento axonal e ainda podem estimular os neurônios lesionados. Além disso, podem inibir a formação da cicatriz glial e estimular células-tronco neurais endógenas<sup>(19)</sup>.

### **3.1.3 Composição das células-tronco do sangue do cordão umbilical**

O sangue do cordão umbilical e placentário é composto por uma variedade de células-tronco, incluindo células-tronco mononucleares (hematopoiéticas), células-tronco mesenquimais e células-tronco não-hematopoiéticas pluripotentes<sup>(4,31)</sup>. Essas células mononucleares apresentam diferentes estágios de diferenciação, identificáveis por meio da expressão de antígenos específicos, como CD133 e CD34. As células mesenquimais presentes no cordão umbilical, por sua vez, possuem a capacidade de se diferenciar em várias linhagens, incluindo células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. Além disso, demonstram potencial para se diferenciar em células não relacionadas à camada mesodérmica, como células neurais. É importante observar que essas células mesenquimais compartilham semelhanças significativas com as células mesenquimais da medula óssea e não apresentam os marcadores de superfície típicos das células hematopoiéticas<sup>(31)</sup>.

As células multipotentes não-hematopoiéticas estão presentes em menor número e são negativas para o CD45, que é o maior marcador das células hematopoiéticas. Estas células expressam fatores de transcrição comuns às células-tronco pluripotentes, incluindo os fatores OCT4, SOX2 e NANOG. Além disso, expressam marcadores de células-tronco embrionárias como o SSEA-3 e SSEA-4<sup>(31)</sup>.

Comparadas com as células de adultos, as células do SCUP apresentam uma maior proporção de células T imaturas, além de um menor número de células T citotóxicas CD56+ e menor memória imunológica. Estes fatores contribuem para uma menor imunogenicidade deste tipo celular<sup>(4,30)</sup>.

Além disso, os linfócitos das células do SCUP expressam citocinas como interleucina IL-2, IL-6 e IL-7, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferon (IFN- $\gamma$ ) e seus receptores em menor grau do que as células sanguíneas adultas, e os linfócitos produzem uma maior quantidade da citocina anti-inflamatória IL-10, com capacidade de suprimir a ativação imunológica do hospedeiro<sup>(4)</sup>.

Portanto, estas células são uma excelente opção para terapias celulares nos TRMs pois apresentam maior segurança doador-receptor devido às suas características imunodeficientes únicas e capacidade multipotente de se diferenciar ou se tornar várias linhagens, incluindo células neurais<sup>(4)</sup>.

### 3.2 ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM LESÕES MEDULARES

Os modelos de lesão medular em animais são baseados no mecanismo de lesão, e podem ser divididos em: compressão, contusão, luxação, transecção e modelos químicos. Os modelos em ratos ou camundongos são amplamente utilizados pois são menos custosos, mais fáceis de cuidar e podem ser estudados em um número maior. São animais com uma anatomia bem compreendida e um potencial mínimo de desenvolver infecções cirúrgicas. Além disso, desenvolvem cavidades císticas grandes no local da lesão, semelhante aos humanos<sup>(32)</sup>.

Em 1993, o primeiro estudo multicêntrico de lesão da medula espinhal em animais (MASCIS) foi conduzido com o intuito de validar um modelo para pesquisas multicêntricas de terapias. Nesse estudo, oito centros especializados em lesões medulares uniram esforços para avaliar cerca de 800 ratos anualmente. O escopo do modelo MASCIS transcende a mera concepção de um dispositivo para provocar contusão na medula espinhal. Este modelo abrange critérios meticulosos para a seleção dos animais, englobando aspectos como linhagem, peso corporal e cuidados perioperatórios<sup>(33)</sup>.

### 3.2.1 Escalas de avaliação funcional em camundongos

A inclusão de escalas de avaliação desempenha um papel crucial na condução de estudos científicos, pois facilita a realização de análises e comparações objetivas entre os dados e as pesquisas de determinados temas. As escalas mais utilizadas nos estudos experimentais com camundongos serão descritas a seguir.

#### 3.2.1.1 *Basso mouse scale* (BMS)

A escala *basso mouse* para locomoção é um método utilizado para avaliar a recuperação locomotora após lesão na medula espinhal em camundongos. Essa escala foi desenvolvida em 2006 e tem sido amplamente utilizada em pesquisas na área de lesão medular em camundongos<sup>(34)</sup>.

A escala consiste em uma série de pontuações que avaliam o desempenho dos camundongos em relação à sua capacidade de locomoção. Ela varia de 0 a 9, sendo que uma pontuação maior indica uma recuperação locomotora mais completa<sup>(34)</sup>.

Os critérios avaliados na escala incluem aspectos como a habilidade de estender as patas, a capacidade de dobrar as articulações das patas e a capacidade de sustentar o peso corporal<sup>(34)</sup> (Anexo A).

A escala é aplicada em diferentes momentos após a lesão na medula espinhal, permitindo a avaliação da progressão da recuperação ao longo do tempo. Além disso, permite uma avaliação objetiva e padronizada da recuperação locomotora em camundongos, facilitando a comparação e a interpretação dos resultados entre diferentes estudos<sup>(34)</sup>.

#### 3.2.1.2 *Motor function score* (MFS)

No estudo realizado por Farooque<sup>(35)</sup>, em 2000, foi desenvolvida uma escala de avaliação locomotora para medir a função motora dos membros posteriores em camundongos que foram submetidos a diferentes graus de compressão para induzir lesão na medula espinhal. Essa escala consiste em uma série de pontuações que representam diferentes níveis de função motora, abrangendo desde a ausência de movimento até a capacidade de caminhar em barras estreitas (Anexo B). As avaliações foram conduzidas em ambientes de campo aberto, bem como utilizando barras com diferentes distâncias, resultando em uma pontuação progressivamente maior conforme o desempenho motor dos camundongos melhora.

### 3.2.1.3 Avaliação por meio da escada horizontal

O método de avaliação motora conhecido como “escada horizontal” foi inicialmente concebido por Bolton et al.<sup>(36)</sup> para ratos e, posteriormente, adaptado por Cummings et al.<sup>(37)</sup> visando a sua aplicação em camundongos. O procedimento de avaliação funcional mediante a escada horizontal compreende a observação da movimentação do camundongo em um plano horizontal delineado por barras de ferro com um diâmetro de 0,4 cm, espaçadas a 1,5 cm de intervalo. A plataforma utilizada possui dimensões de 100 cm de comprimento por 35 cm de largura, elevando-se a 46 cm a partir de sua base. Os animais são submetidos a um treinamento prévio com o objetivo de percorrer a plataforma, fazendo uso das barras de ferro para assegurar a estabilidade e evitar quedas<sup>(37)</sup>.

O propósito subjacente a esse teste é avaliar a função proprioceptiva dos animais. Durante a fase de treinamento pré-experimental, os camundongos são encorajados a atravessar a plataforma, com o objetivo de alcançar uma fonte de água com açúcar disposta no extremo oposto ao ponto inicial<sup>(37)</sup>.

### 3.2.2 Estudos experimentais com células-tronco em traumatismo raquimedular

Em 1999, Mc Donald et al.<sup>(38)</sup> conduziram um estudo no qual observaram uma melhora funcional em ratos submetidos ao transplante de células-tronco embrionárias de camundongos, que foram diferenciadas em células-tronco neurais, nove dias após a lesão traumática. Análises histológicas realizadas após 2 e 5 semanas revelaram a diferenciação das células-tronco em astrócitos, oligodendrócitos e neurônios. Os pesquisadores também observaram uma melhora na sustentação de carga e na coordenação das patas traseiras dos animais que receberam as células-tronco

Em 2000, Liu et al.<sup>(39)</sup> conseguiram produzir oligodendrócitos in vitro a partir de células-tronco embrionárias induzidas por ácido retinóico, e esses oligodendrócitos foram capazes de promover a remielinização de axônios em culturas celulares.

Lu et al.<sup>(40)</sup> constataram que o transplante de células-tronco neurais de camundongos (C17.2) resultou em um aumento significativo no crescimento axonal na região lesionada da medula cervical de ratos adultos. Os autores identificaram como o mecanismo mais provável de estímulo ao crescimento axonal a produção aumentada de fatores de crescimento, como NGF, BDNF e GDNF, por essas células transplantadas.

Lee et al.<sup>(41)</sup> demonstraram a migração e diferenciação das CTMs da medula óssea de camundongos em células do sistema nervoso central de camundongos. Os pesquisadores empregaram células-tronco em modelos de lesão cerebral isquêmica e lesão medular traumática, previamente marcadas com bisbenzimidaz, e observaram a diferenciação dessas células em neurônios e astrócitos após um período de 4 semanas.

Koshizuka et al.<sup>(42)</sup> conduziram um estudo experimental em camundongos para avaliar os resultados do transplante de células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos, realizado 7 dias após a lesão medular. Os pesquisadores observaram melhorias funcionais no grupo de animais que recebeu o transplante de células, com uma diferença estatisticamente significativa em comparação com os demais grupos. Além disso, constatou-se que as células transplantadas sobreviveram e se diferenciaram em linhagens neurais, demonstrando a expressão de marcadores de oligodendrócitos, astrócitos e precursores neuronais, embora não tenha sido observada a diferenciação em neurônios.

Zhao et al.<sup>(43)</sup> demonstraram que as células-tronco do sangue do cordão umbilical foram mais eficazes do que as células estromais da medula óssea no tratamento do TRM. Os pesquisadores compararam o resultado funcional do tratamento com esses dois tipos de células-tronco humanas em ratos adultos com TRM, administradas por via intraespinal. Houve uma melhora estatisticamente significativa no resultado funcional e na taxa de sobrevivência nos grupos tratados com células em comparação com os controles. Os ratos que receberam as células-tronco do sangue do cordão umbilical apresentaram uma melhora funcional mais pronunciada do que aqueles que receberam células estromais da medula óssea nos dias 7 e 14 após o transplante.

Mansilla et al.<sup>(44)</sup> investigaram o reparo de lesões cutâneas e da secção da medula espinhal em camundongos utilizando células-tronco mesenquimais da medula óssea humana. As células foram administradas em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL, sendo infundidos 2 mL da solução na veia da cauda dos camundongos em dois grupos (lesão cutânea e medular). Em outros dois grupos também submetidos à lesão cutânea e medular, além da infusão endovenosa, os autores aplicaram localmente uma matriz de fibrina contendo as células-tronco na lesão cutânea e na lesão da medula espinhal. Não foi observada reação imunológica às células humanas em nenhum dos animais, seja nos grupos com infusão sistêmica apenas, seja nos

grupos com infusão local e sistêmica, indicando a baixa reatividade imunológica das células-tronco mesenquimais da medula óssea humana. Além disso, os grupos tratados com células-tronco infundidas de forma local e sistêmica apresentaram melhores taxas de cicatrização da pele e recuperação neurológica após o trauma medular.

Kao et al.<sup>(45)</sup> investigaram o emprego de células-tronco do cordão umbilical (CD34+) de humanos administradas sistemicamente em modelos de TRM em ratos. Os pesquisadores constataram uma melhoria funcional na força das patas traseiras dos ratos tratados com as células-tronco, acompanhada por uma redução nas taxas de apoptose e infarto na área da lesão. Além disso, foi observada a presença do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e do fator neurotrófico derivado da linha celular glial (GDNF) na região afetada.

Khodabandeh et al.<sup>(46)</sup> realizaram uma análise histológica da medula espinal de camundongos Balb C submetidos ao TRM e tratados com células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos adultos, administradas por via intravenosa um dia após a lesão. A avaliação foi realizada após 3 e 5 semanas do tratamento. Os pesquisadores observaram um aumento no número de neurônios no grupo tratado com as células-tronco em comparação com o grupo controle, evidenciando o potencial regenerativo dessas células-tronco.

Obara et al.<sup>(3)</sup> realizaram o implante de células-tronco associadas ao folículo piloso em camundongos submetidos ao TRM, 21 dias após o trauma. Os pesquisadores demonstraram que as células-tronco foram capazes de se diferenciar em neurônios, oligodendrócitos e astrócitos. Além disso, foi observada uma melhora funcional no grupo de camundongos tratados com as células-tronco, acompanhada por uma redução na resposta inflamatória e supressão da atrofia medular.

## **4 MÉTODOS**

## 4.1 ÉTICA

Este protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesp) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) por meio da Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº 1247/2019) (Anexo C).

Os animais deste estudo foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), o qual adere a estritos protocolos de controle sanitário, visando a minimização do potencial de disseminação de patologias. A manipulação dos animais foi executada por um técnico com expertise significativa, submetido a treinamento especializado, afiliado ao Laboratório de Lesão Medular do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da USP (IOT-FMUSP).

A pesquisa foi realizada em conformidade com os princípios éticos estabelecidos pelo *Canadian Council on Animal Care* (CCAC) e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## 4.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados neste estudo 40 camundongos Balb C. Os animais foram todos do sexo masculino, pesavam entre 20 g a 35 g e com idade entre 10 e 12 semanas de vida. Além disso apresentavam pelagem e estado clínico normais, bem como condições normais de motricidade.

No primeiro contato com os animais, cada camundongo foi submetido a uma avaliação geral realizada pelo pesquisador e pelo veterinário responsável pelo laboratório.

Os critérios de exclusão estabelecidos neste estudo foram os seguintes:

- a) Óbito após o trauma medular experimental.
- b) Identificação de más formações ou anomalias anatômicas na região a ser operada durante a inspeção visual.
- c) Ocorrência de automutilação ou canibalismo entre os animais durante o período de observação.
- d) Ausência de déficit neurológico ou motricidade normal na primeira avaliação após a contusão medular - pontuação 9 na escala BMS.



Os animais foram alojados em gaiolas no Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e de Nervos (LETRAN) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP. Cada gaiola tinha capacidade para até três camundongos e possuía dimensões de 60 cm x 40 cm, garantindo conforto e espaço adequado para a locomoção dos animais.

#### 4.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO

O sangue do cordão umbilical placentário foi coletado de um recém-nascido cujos pais deram consentimento mediante um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo D). A coleta foi realizada no momento do parto, imediatamente após o clampeamento e corte do cordão umbilical e a entrega do recém-nascido ao pediatra. O procedimento de coleta foi asséptico, envolvendo a punção de um vaso ou artéria do cordão umbilical com o uso de uma bolsa de coleta específica para sangue de cordão umbilical e placentário. Isso ocorreu antes e após a dequitação da placenta, sendo todo o processo conduzido em condições estéreis.

Simultaneamente, a parturiente teve uma amostra de seu sangue periférico coletada para a identificação de doenças transmissíveis pelo sangue, de acordo com as normas nacionais e internacionais aplicáveis a bancos de sangue de cordão umbilical e placentário. Isso incluiu testes para HIV1 e 2, HTLV I/II, doença de Chagas, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus, hepatite B e C, bem como sorologias específicas para dengue, zika, chikungunya e Sars-CoV2. Essas amostras também passaram por triagem molecular para HIV, HCV e HBV.

Após a coleta, o material foi adequadamente armazenado em uma frascueira térmica designada para manter a temperatura ideal durante o transporte. O transporte foi realizado até o laboratório de processamento da empresa Cryopraxis® (Criobiologia Ltda), seguindo as diretrizes estabelecidas pela Resolução RDC nº 508 da ANVISA, datada de 2021.

Posteriormente, o SCUP foi submetido a um processo de processamento celular, envolvendo testes de viabilidade celular, quantificação e análise imunofenotípica. Além disso, procedimentos automatizados de testes microbiológicos foram realizados no material processado para detectar a eventual presença de micro-organismos aeróbios e anaeróbios.

#### 4.4 CRIOPRESERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS EM BIORREPOSITÓRIO

A fração composta majoritariamente por células mononucleares, obtida a partir das células nucleadas totais, foi preservada em criotubos armazenados em um estojo de metal específico para acondicionamento criogênico. A concentração utilizada foi de  $1 \times 10^7$  células por mililitro, mantidas em uma solução crioprotetora. Essas células foram armazenadas em nitrogênio líquido a uma temperatura de  $-196^\circ\text{C}$ , onde permaneceram até o início das intervenções cirúrgicas experimentais.

Em conformidade com as diretrizes estabelecidas na Resolução CNS 441/11 e na Portaria MS 2201/11, uma amostra de referência foi devidamente preservada ao longo da vigência do projeto. Isso foi feito com o propósito de garantir o acesso gratuito e a disponibilidade das informações associadas ao material biológico empregado, incluindo, mas não se limitando às informações de natureza genética.

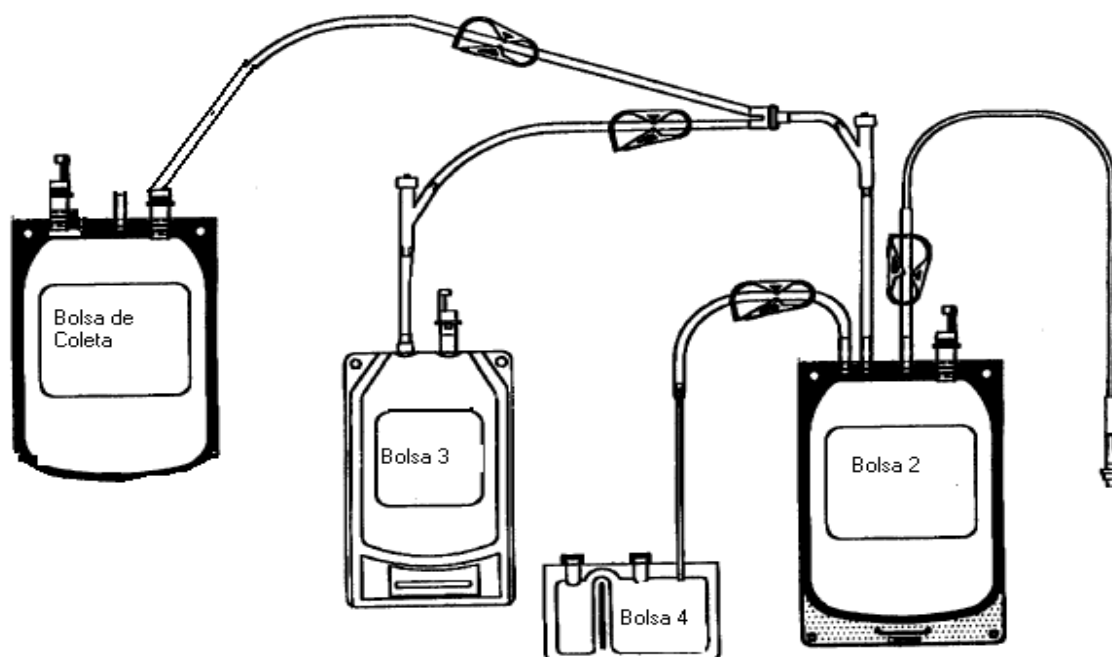
#### 4.5 PROCESSAMENTO DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO

A bolsa de coleta, contendo SCUP, passou por uma etapa de pesagem, com o propósito de determinar o volume do sangue de cordão umbilical e placentário coletado. Nessa avaliação, foi adotada a relação de 1 g de SCUP equivalente a 1 mL.

Subsequentemente, a bolsa foi submetida a uma agitação em homogeneizador orbital por um período de 5 minutos. Após essa etapa, a bolsa foi transferida para uma cabine de segurança biológica Classe IIA (equipamento que cria um ambiente controlado para a manipulação segura de materiais biológicos ou químicos de baixo risco, com fluxo de ar unidirecional para proteger o operador e o material), onde uma amostra inicial foi retirada para fins de quantificação das células nucleadas totais. Simultaneamente, nessa fase, procedeu-se à adição de hidroxietilamido em uma proporção de 1:5 ao conteúdo da bolsa.

Dentro da cabine de segurança biológica, estabeleceu-se a conexão entre o kit de processamento e a bolsa de coleta.

**Figura 1 - Desenho esquemático do kit processamento acoplado a bolsa de coleta**



Bolsa 1: coleta, Bolsa 2: processamento, Bolsa 3: plasma, Bolsa 4: congelamento.

O conjunto composto pela bolsa de coleta, acoplada ao kit de processamento, foi inserido em um homogeneizador orbital, onde permaneceu por 20 minutos. Após a homogeneização, o conjunto passou por centrifugação em uma centrífuga de grande porte, mantida sob condições refrigeradas, para a separação do plasma enriquecido com leucócitos.

Posteriormente à centrifugação, a bolsa de coleta foi cuidadosamente posicionada em um extrator manual, evitando qualquer perturbação das células. A fração superior, contendo o plasma enriquecido com leucócitos, foi então transferida para a bolsa de transferência (bolsa 2).

O segmento entre a bolsa de coleta e a bolsa de processamento foi hermeticamente selado para permitir a pesagem e a determinação do volume do plasma enriquecido com leucócitos após a sedimentação.

O kit de processamento foi conduzido para uma cabine de segurança biológica Classe IIA, onde uma amostra foi retirada para a quantificação final das células nucleadas totais, das células CD34+ viáveis, das células mononucleares, do percentual de eritroblastos, da presença de Hemoglobinas anormais e da viabilidade celular por meio do método de exclusão com azul de trypan.

O kit de processamento foi então submetido a uma segunda centrifugação, com o objetivo de sedimentar os leucócitos e reduzir o volume do material.

## 4.6 DESCONGELAMENTO CELULAR

O descongelamento dos criotubos foi conduzido de maneira a preservar a viabilidade celular minimizando as perdas, em conformidade com o protocolo estabelecido pela empresa Cryopraxis. Para esse fim, foi empregada uma solução hipertônica de Plasmin<sup>®</sup> com albumina.

### 4.6.1 Preparo da solução hipertônica de descongelamento

A solução de descongelamento foi preparada com um mínimo de 30 minutos de antecedência em relação ao início do processo, garantindo sua refrigeração antes do uso. Na cabine de segurança biológica, a porta de punção do Plasmin<sup>®</sup> foi limpa de forma aséptica utilizando um *swab* de álcool a 70%. Em seguida, utilizando uma seringa de 60 mL e uma agulha de 40x12, um volume de 37,5 mL de Plasmin<sup>®</sup> foi coletado e transferido para um tubo cônico de 50 mL, garantindo a assepsia durante todo o procedimento.

Posteriormente, a rolha de vedação do frasco de Albumina foi limpa da mesma forma, utilizando um *swab* de álcool a 70%. Utilizando uma nova seringa de 20 mL e uma agulha de 40x12, 12,5 mL da solução de albumina 20% foram retirados e adicionados ao tubo cônico de 50 mL. Dessa forma, obteve-se uma solução de descongelamento Plasmin<sup>®</sup>/Albumina 5%, que foi mantida refrigerada até o momento de sua utilização.

### 4.6.2 Descongelamento da unidade

As unidades de sangue do cordão umbilical passaram pelo processo de criopreservação em uma solução contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e plasma autólogo. Após o descongelamento, as células foram prontamente diluídas com uma solução hipertônica composta por 5% de albumina humana e 95% de Plasmin<sup>®</sup> (hidroxietil amido 450/0,7 6%). O descongelamento das unidades de sangue do cordão criopreservadas foi realizado rapidamente em um banho-maria a 37°C, levando cerca de 3 minutos para ser concluído. Cada unidade foi descongelada separadamente, e a amostra permaneceu em temperatura reduzida durante o processo. O conteúdo celular presente na suspensão foi gradual e suavemente diluído com a referida solução hipertônica.

### 4.6.3 Diluição da amostra em criotubos

A solução de descongelamento foi dividida em alíquotas antes do início do processo, devido à necessidade de um descongelamento ágil. Todo o procedimento foi realizado de maneira asséptica.

Para cada tubo a ser descongelado, 5 mL da solução de Plasmina/albumina foram adicionados a um tubo de cônico estéril de 50 mL e reservados. Foram preparadas duas seringas de 10 mL, uma contendo 2 mL da solução de Plasmina/albumina e outra com 1 mL da solução, ambas também foram reservadas.

Utilizando a seringa contendo 1 mL da solução preparada previamente, gotejou-se a solução no criotubo, promovendo uma diluição inicial de 1:1 (1 mL de amostra: 1 mL de solução de descongelamento). Em seguida, aspirou-se todo o conteúdo do criotubo, transferindo-o lentamente para o tubo cônico contendo a solução de descongelamento.

Com a seringa contendo 2 mL da solução, adicionou-se o volume no criotubo, promovendo a lavagem das paredes do tubo e coletando as células residuais. Esse processo foi repetido mais uma vez, garantindo que nenhuma parte do material tenha sido desperdiçada.

Transferiu-se todo o conteúdo da seringa, onde ocorreu a diluição, de forma lenta para o tubo cônico de 50 mL. O tubo foi vedado usando manipulação asséptica e o conteúdo foi misturado por circulação manual lenta. A diluição final da amostra foi de 1:10.

#### 4.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram submetidos a manipulação e estimulação prévia ao experimento com o objetivo de habituá-los aos pesquisadores e ao procedimento de avaliação da função motora realizado após a indução da lesão medular traumática. Os camundongos foram distribuídos, por sorteio simples, em cinco grupos de oito animais cada, todos submetidos à lesão medular experimental moderada. A gravidade da lesão foi determinada com base no estudo de padronização de lesão medular em camundongos realizado por Borges et al.<sup>(15)</sup>, em 2018, de modo a produzir uma lesão moderada, com uma taxa de complicações aceitável. Os grupos foram distribuídos conforme descrito adiante:

- **Grupo 1:** os animais foram submetidos à contusão medular por queda de peso (10 g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS através de um impactor da Univeridade de Nova York (*NYU Impactor*). Uma única injeção de  $4 \times 10^5/40 \mu\text{L}$  – CMN –SCUP, foi aplicada no local da lesão imediatamente após a contusão medular.
- **Grupo 2:** os animais foram submetidos à contusão medular por queda de peso (10 g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS através do uso do *NYU Impactor*. Uma única injeção de  $4 \times 10^5/40 \mu\text{L}$  – CMN –SCUP, foi aplicada no local da lesão após 7 dias da contusão medular.
- **Grupo 3:** os animais foram submetidos à contusão medular por queda de peso (10 g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS através do uso do *NYU Impactor*. Uma única injeção com volume de  $40 \mu\text{L}$  de solução fisiológica foi aplicada no local da lesão, imediatamente após a contusão medular.
- **Grupo 4:** os animais foram submetidos à contusão medular por queda de peso (10 g) de 12,5 mm de altura, utilizando o modelo MASCIS através do uso do *NYU Impactor*.
- **Grupo 5:** os animais foram submetidos à via de acesso e laminectomia e não foram submetidos à contusão medular.

A inclusão dos grupos controle foi realizada com o objetivo de mitigar possíveis vieses e reforçar a validade interna dos resultados obtidos. O Grupo 3 foi concebido para investigar se a administração do mesmo volume de solução fisiológica sobre a

medula, sem a presença de células-tronco, teria algum efeito. O Grupo 4 foi designado para compreender os efeitos exclusivos do trauma raquimedular, sem qualquer intervenção adicional. Por sua vez, o Grupo 5 contribuiu para distinguir eventuais efeitos da intervenção cirúrgica (via de acesso e laminectomia) dos efeitos do trauma medular propriamente dito.

## 4.8 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR

### 4.8.1 Protocolo de anestesia

Os animais receberam medicação pré-anestésica consistindo de cloridrato de tramadol na dose de 0,3 mg por 100 gramas de peso corporal, combinado com meloxicam na dose de 0,02 mg por 100 gramas de peso corporal, administrados via subcutânea<sup>(47)</sup>.

Para a indução anestésica, um equipamento de anestesia inalatória Bonther foi empregado. Os animais foram colocados em uma caixa de indução anestésica inalatória contendo Isoflurano. Após a confirmação do plano anestésico, determinada por meio do pinçamento da pata traseira, pinçamento da cauda e observação da ausência de reflexo da córnea, eles foram transferidos para uma máscara de nebulização com Isoflurano a uma concentração de 2%<sup>(47)</sup>.

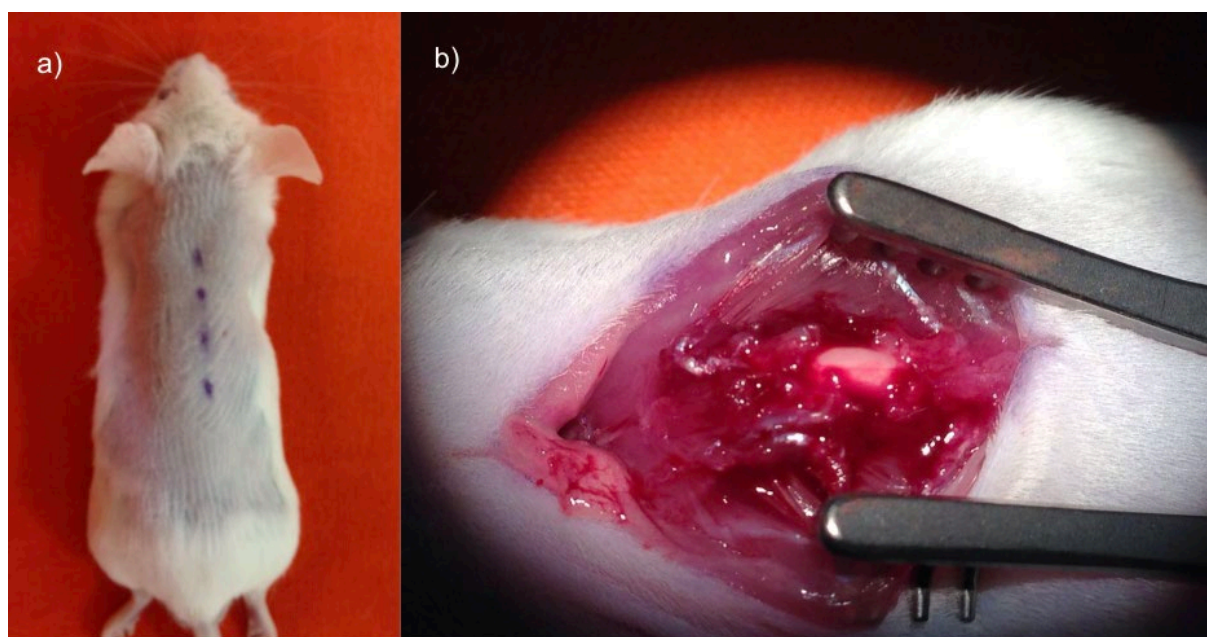
### 4.8.2 Procedimento cirúrgico

Após a confirmação do plano anestésico, procedeu-se à tricotomia da região dorsal, seguida de antissepsia utilizando clorexidina. Em seguida, realizou-se uma incisão longitudinal na região que compreendeu da vértebra T7 à T11.

Posteriormente, mediante dissecação em camadas, a musculatura paravertebral foi exposta, permitindo a visualização dos componentes posteriores da coluna dorsolombar. Subsequentemente, executou-se a laminectomia da vértebra T9 no sentido caudocranial, com o objetivo de expor a medula espinhal (Figura 2). A determinação precisa do nível de laminectomia foi conduzida mediante contagem das vértebras. Inicialmente, identificou-se a costela mais distal, correspondente à décima terceira vértebra torácica, a partir da qual se procedeu à contagem das vértebras, no sentido distal para proximal, até a localização do ponto onde a intervenção cirúrgica foi realizada<sup>(15)</sup>.

Durante todo o procedimento cirúrgico, utilizou-se um microscópio cirúrgico para reduzir ao mínimo os riscos de danos adicionais à medula espinhal, seguindo as diretrizes padronizadas conforme descrito por Borges et al.<sup>(15)</sup>.

**Figura 2 - a) Planejamento cirúrgico da incisão no dorso do camundongo; b) Laminectomia de T9 com exposição medular**



#### 4.8.3 Contusão medular e transplante celular

As lesões foram produzidas obedecendo o protocolo internacional MASCIS; utilizando um impactor da universidade de Nova York (*NYU Impactor*)<sup>(48-50)</sup>. Todos os animais foram submetidos à lesão moderada da medula espinhal com queda do peso de 10 g da altura de 12,5 mm (Figura 3) <sup>(15)</sup>. Após a lesão, foi aplicado no local lesionado soro fisiológico ou a solução com células-tronco, de acordo com o grupo do qual se tratava o animal, seguindo-se à cauterização, aproximação dos tecidos e sutura da pele<sup>(33)</sup>.



**Figura 3 - Impacto medular através do *NYU Impactor***



O transplante celular foi conduzido de maneira congruente com os métodos anteriormente documentados na literatura. Quatro injeções de 10  $\mu$ L cada, administradas bilateralmente em relação à linha média, tanto rostral quanto caudal ao epicentro da lesão, foram realizadas empregando uma micropipeta delicadamente manipulada <sup>(51,52)</sup>.

#### **4.8.4 Pós-operatório**

Três animais foram alojados por gaiola, com dimensões de 60 cm x 40 cm, onde tiveram acesso irrestrito a ração e água. Foi realizada uma rotina diária de massagem vesical para esvaziamento da bexiga, acompanhada pela avaliação contínua de potenciais complicações, incluindo o rastreamento de infecções urinárias. Isso foi feito para garantir o bem-estar e monitorar a saúde dos animais ao longo do estudo <sup>(15,33,47,50)</sup>.

#### **4.8.5 Analgesia**

Foi administrado cloridrato de tramadol subcutaneamente a cada 8 horas, na proporção de 0,3 mg por 100 gramas de peso corporal, ao longo de um período de 5 dias<sup>(15,47,53)</sup>.

#### **4.8.6 Antibiticoprofilaxia**

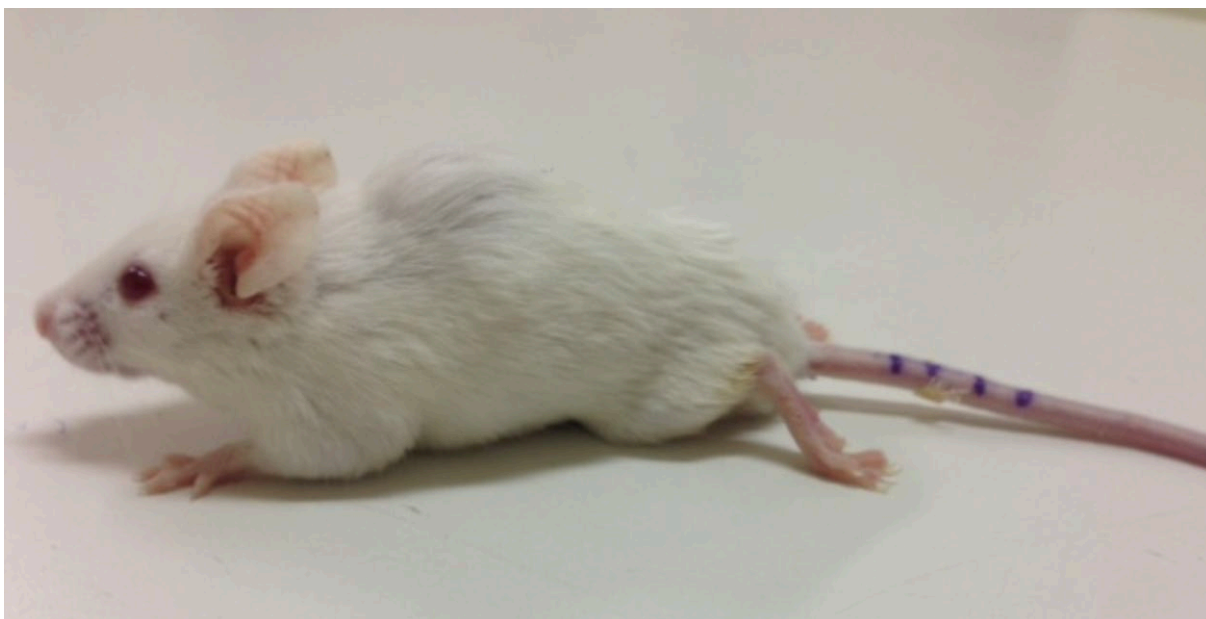
Foi implementado um protocolo de profilaxia com antibiótico utilizando amoxicilina, na dose de 15 mg por 100 gramas de peso corporal, administrada via subcutânea a cada 12 horas, ao longo de um período de 7 dias<sup>(15,33)</sup>.

### **4.9 DESFECHOS ANALISADOS**

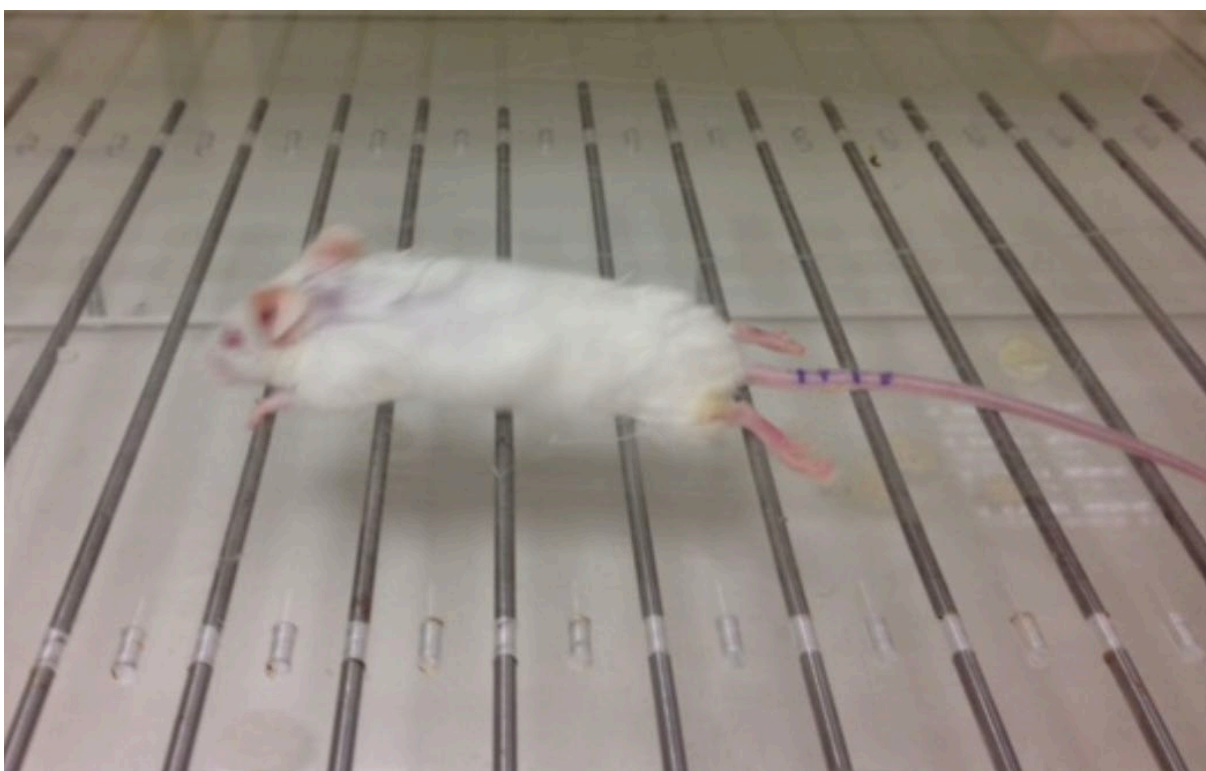
#### **4.9.1 Avaliação motora**

Durante os 42 dias de pós-operatório os animais foram avaliados através de três escalas motoras funcionais, a BMS, o MFS e o plano horizontal (Figuras 4 e 5)<sup>(34,35,54)</sup>. As avaliações foram realizadas de forma visual por dois observadores treinados, cegos quanto ao grupo de estudo de cada animal. Todos os camundongos foram avaliados antes da lesão medular e nos dias 2º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º após a lesão. Foi escolhida a menor nota entre os dois avaliadores (Anexos A e B).

**Figura 4 - Avaliação motora pós contusão medular, ilustrando a ausência de movimentação das patas traseiras e a cauda abaixada**



**Figura 5 - Avaliação motora do plano horizontal após lesão medular**



#### 4.9.2 Avaliação histológica

Após a conclusão do período de avaliação motora, os animais foram submetidos a um novo procedimento anestésico, seguido de perfusão transcardíaca utilizando uma solução de salina e paraformaldeído a 4%, devidamente tamponada com pH fisiológico. A medula espinhal foi então cuidadosamente removida de todos os animais imediatamente após a perfusão e a indução de uma morte indolor. Essas estruturas foram mantidas no mesmo fixador por um período de 24 horas.

Na avaliação inicial, procedeu-se à observação externa em busca de potenciais lesões relacionadas à autofagia ou automutilação. Em seguida, efetuou-se a remoção da coluna vertebral por meio de uma abordagem de acesso ampla na região dorsal do animal. Utilizando um micro sacabocados, as estruturas ósseas e os tecidos moles circundantes à medula foram meticulosamente ressecados, com o objetivo de alcançar uma exposição total da medula espinhal.

A medula espinal foi dissecada e posteriormente ressecada a partir do nível intervertebral de T8 ao nível T12. Em seguida foi inspecionada macroscopicamente no local da contusão para verificar se havia alguma alteração estrutural que preenchesse critério de exclusão.

Em seguida foi realizada incisão ventral, com toracotomia e laparotomia associadas. Foram inspecionados os pulmões e as vísceras abdominais quanto a presença de alterações sugestivas de processos infecciosos ou anormalidades estruturais que pudessem influenciar nos resultados.

A medula retirada foi encaminhada em frascos, devidamente identificados, com solução de formaldeído (10%) para o Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Após a conclusão do procedimento de ressecção medular, os animais foram colocados em sacos plásticos brancos devidamente etiquetados e, em conformidade com as diretrizes do protocolo de descarte de carcaças da FMUSP, foram encaminhados para descarte adequado.

O estudo histológico consistiu na análise de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE) através de microscopia óptica. A unidade ressecada da medula foi processada e desidratada em bateria de álcoois, depois sofreu processo de diafanização em xilol e posteriormente foi incluída em parafina. Após a inclusão

em blocos de parafina, foram realizados cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura em um micrótomo elétrico (Leica RM 2055). Esses cortes foram feitos a meio centímetro acima e meio centímetro abaixo da área central da lesão. Os tecidos resultantes foram montados em lâminas de vidro e corados utilizando a técnica de hematoxilina-eosina<sup>(55)</sup>.

Conseqüentemente, foram produzidas três lâminas para cada medula, designadas como A, B e C. As lâminas A e C representavam, respectivamente, as regiões proximal e distal ao local da lesão e foram coletadas como controles individuais em cada camundongo. Por sua vez, o fragmento B correspondia ao local da lesão em si, distinguindo-se dos fragmentos A e C.

A avaliação das lâminas foi realizada por um patologista de forma cega, sem o conhecimento do grupo a qual pertencia cada animal estudado.

A análise microscópica foi realizada em campo microscópico com lente objetiva de 100 x com imersão em óleo, lente auxiliar de 1,6 x e fotografadas com câmera digital na resolução de 640 x 470 pixels.

Foram avaliados cinco parâmetros: necrose, hemorragia, hiperemia, degeneração da substância branca (cística) e infiltrado celular. Cada um destes parâmetros recebeu uma graduação de 0 a 3 quanto à intensidade das alterações (0 – ausente; 1 – discreto; 2 – moderado; 3 – intenso). O grau 1 indicou a presença dessas alterações em até um terço da largura da medula espinhal na área da lesão, o grau 2 indicou tais alterações em um a dois terços da largura da medula espinhal, e o grau 3 indicou tais alterações em mais de dois terços da largura da medula espinhal.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros avaliados foram detalhados com base nos grupos e nos momentos de avaliação. Foram utilizadas medidas estatísticas resumidas, incluindo média, desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo. A comparação entre os parâmetros foi realizada por meio de equações de estimação generalizadas (EEG) com uma distribuição normal e uma função de ligação identidade. Além disso, assumiu-se uma matriz de correlações autorregressivas de primeira ordem entre os momentos de avaliação no caso das medidas BMS e MFS. Para o teste do plano horizontal, utilizou-se o número de passos como um fator limitante dos dados (*offset*). Todas as análises foram seguidas por comparações múltiplas de Bonferroni para identificar quais grupos ou momentos apresentaram diferenças significativas.

Em relação aos parâmetros histológicos, foram descritas as informações de acordo com os grupos, utilizando frequências absolutas e relativas. As comparações entre os grupos foram realizadas por meio de testes Kruskal-Wallis, seguidos de comparações múltiplas de Dunn sempre que se observaram diferenças significativas.

Para a condução das análises, foi empregado o software IBM-SPSS for Windows versão 22.0. Para a tabulação dos dados, utilizou-se o software Microsoft Excel 2013. Partiu-se da hipótese nula de equidade, mantendo uma probabilidade de erro tipo I de 5% e uma probabilidade de erro tipo II de 20%.

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 ANÁLISE FUNCIONAL

Durante a análise funcional dos camundongos, tanto pela escala BMS como pela escala MFS, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. Os resultados podem ser observados na Tabela 1 e nos Gráficos 1 e 2.

A Tabela 1 revela que o desempenho médio dos grupos ao longo dos períodos avaliados, em ambas as escalas, apresentou similaridade estatística ( $p_{\text{Interação}} > 0,05$ ). Observou-se uma diferença média estatisticamente significativa entre os diferentes períodos de avaliação para ambas as escalas ( $p_{\text{Momento}} < 0,05$ ), porém não foram observadas diferenças médias estatisticamente significativas entre os grupos ( $p_{\text{Grupo}} > 0,05$ ).



**Tabela 1 - Descrição das escalas BMS e MFS segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações**

Variável/Grupo	Momento de avaliação								p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré	2 Dias	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6			
<b>BMS</b>									0,867	<b>&lt;0,001</b>	0,992
<b>Lesão + CT imediato</b>											
Média ± DP	9 ± 0	0 ± 0	0,13 ± 0,35	1,25 ± 0,71	1,38 ± 0,52	1,88 ± 0,64	2,75 ± 0,46	2,75 ± 0,46			
Mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	1 (0; 2)	1 (1; 2)	2 (1; 3)	3 (2; 3)	3 (2; 3)			
<b>Lesão + CT 7 dias</b>											
Média ± DP	9 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,38 ± 0,52	1,63 ± 0,74	1,88 ± 0,64	2,75 ± 0,46	2,75 ± 0,46			
Mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1 (1; 2)	1,5 (1; 3)	2 (1; 3)	3 (2; 3)	3 (2; 3)			
<b>Lesão + Soro fisiológico</b>											
Média ± DP	9 ± 0	0 ± 0	0,13 ± 0,35	1,25 ± 0,71	1,38 ± 0,52	1,88 ± 0,64	2,75 ± 0,46	2,75 ± 0,46			
Mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	1 (0; 2)	1 (1; 2)	2 (1; 3)	3 (2; 3)	3 (2; 3)			
<b>Lesão</b>											
Média ± DP	9 ± 0	0 ± 0	0,13 ± 0,35	1,25 ± 0,71	1,38 ± 0,52	1,88 ± 0,64	2,75 ± 0,46	2,75 ± 0,46			
Mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	1 (0; 2)	1 (1; 2)	2 (1; 3)	3 (2; 3)	3 (2; 3)			
<b>Sham</b>											
Média ± DP	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0			
Mediana (mín.; máx.)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)			

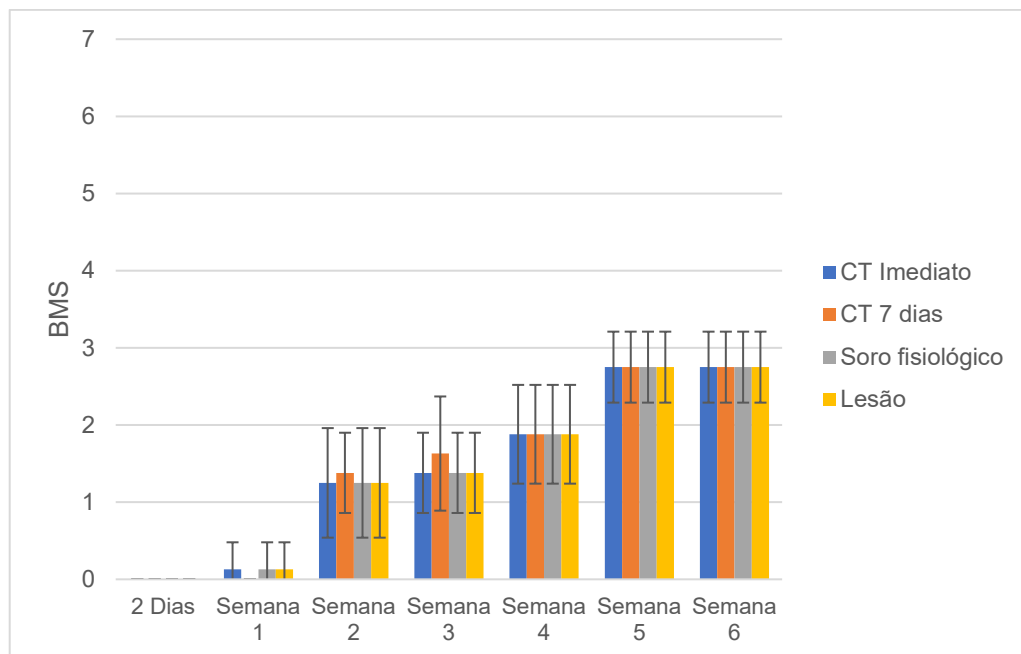
*continua*

Variável/Grupo	Momento de avaliação								conclusão		
	Pré	2 Dias	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	p Grupo	p Momento	p Interação
<b>MFS</b>									0,996	<b>&lt;0,001</b>	0,995
<b>Lesão + CT imediato</b>											
Média ± DP	11,88 ± 0,64	0 ± 0	0,13 ± 0,35	1,5 ± 0,54	1,5 ± 0,54	1,63 ± 0,52	2,75 ± 1,39	2,88 ± 1,25			
Mediana (mín.; máx.)	12 (11; 13)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	1,5 (1; 2)	1,5 (1; 2)	2 (1; 2)	3 (1; 4)	3 (1; 4)			
<b>Lesão + CT 7 dias</b>											
Média ± DP	11,63 ± 0,74	0 ± 0	0 ± 0	1,63 ± 1,06	1,75 ± 1,04	1,63 ± 0,52	2,75 ± 1,39	2,88 ± 1,25			
Mediana (mín.; máx.)	11,5 (11; 13)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1 (1; 4)	1,5 (1; 4)	2 (1; 2)	3 (1; 4)	3 (1; 4)			
<b>Lesão + Soro fisiológico</b>											
Média ± DP	12 ± 0,76	0 ± 0	0,13 ± 0,35	1,5 ± 0,54	1,5 ± 0,54	1,63 ± 0,52	2,75 ± 1,39	2,88 ± 1,25			
Mediana (mín.; máx.)	12 (11; 13)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	1,5 (1; 2)	1,5 (1; 2)	2 (1; 2)	3 (1; 4)	3 (1; 4)			
<b>Lesão</b>											
Média ± DP	12 ± 0,76	0 ± 0	0,13 ± 0,35	1,5 ± 0,54	1,5 ± 0,54	1,63 ± 0,52	2,88 ± 1,25	2,88 ± 1,25			
Mediana (mín.; máx.)	12 (11; 13)	0 (0; 0)	0 (0; 1)	1,5 (1; 2)	1,5 (1; 2)	2 (1; 2)	3 (1; 4)	3 (1; 4)			
<b>Sham</b>											
Média ± DP	12 ± 0,76	12 ± 0,76	12 ± 0,76	12 ± 0,76	12 ± 0,76	12 ± 0,76	12 ± 0,76	12 ± 0,76			
Mediana (mín.; máx.)	12 (11; 13)	12 (11; 13)	12 (11; 13)	12 (11; 13)	12 (11; 13)	12 (11; 13)	12 (11; 13)	12 (11; 13)			

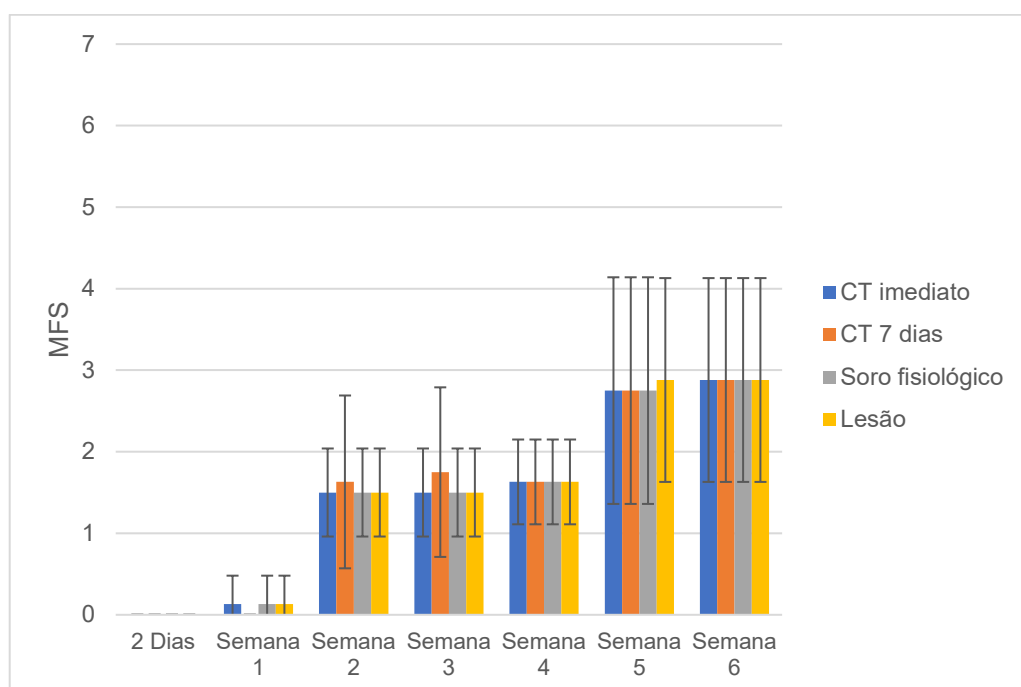
EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos; Só foram usados os momentos pré, 2 dias, 3 e 6 semanas para a análise e não foi utilizado o grupo Sham.

Os Gráficos 1 e 2 ilustram um comportamento muito semelhante na melhora funcional entre os grupos. Todos os grupos na fase pré-lesão medular obtiveram os valores máximos em cada escala (9 pontos na BMS e 11 pontos na MFS). O grupo Sham permaneceu com os valores máximos durante todo o experimento. Com o propósito de facilitar a interpretação e análise gráfica, o tempo pré-lesão e o grupo 5 foram excluídos.

**Gráfico 1 - Comportamento dos grupos durante as semanas segundo a escala BMS**



**Gráfico 2 - Comportamento dos grupos durante as semanas segundo a escala MFS**



A Tabela 2 indica que tanto a escala BMS quanto a MFS demonstraram uma diminuição média do pré para os demais momentos de avaliação, e a partir de 2 dias, aumentaram significativamente em média a cada momento de avaliação, independentemente do grupo ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 2 - Resultado das comparações múltiplas das escalas funcionais entre os momentos de avaliação**

Variável	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
BMS	Pré - 2 dias	9,00	0,10	<0,001	8,75	9,25
	Pré - 3 semanas	7,56	0,09	<0,001	7,32	7,81
	Pré - 6 semanas	6,25	0,09	<0,001	6,01	6,50
	2 dias - 3 semanas	-1,44	0,10	<0,001	-1,69	-1,19
	2 dias - 6 semanas	-2,75	0,09	<0,001	-3,00	-2,51
	3 semanas - 6 semanas	-1,31	0,10	<0,001	-1,56	-1,06
MFS	Pré - 2 dias	11,88	0,21	<0,001	11,32	12,43
	Pré - 3 semanas	10,31	0,20	<0,001	9,79	10,84
	Pré - 6 semanas	9,00	0,20	<0,001	8,47	9,53
	2 dias - 3 semanas	-1,56	0,21	<0,001	-2,12	-1,01
	2 dias - 6 semanas	-2,88	0,20	<0,001	-3,40	-2,35
	3 semanas - 6 semanas	-1,31	0,21	<0,001	-1,87	-0,76

Comparações múltiplas de Bonferroni.

As Tabelas 3 e 4 revelam que todos os parâmetros do plano horizontal exibiram um comportamento médio dos grupos estatisticamente similar ao longo dos momentos de avaliação ( $p$  Interação  $> 0,05$ ). No entanto, observou-se uma diferença média estatisticamente significativa apenas entre os momentos de avaliação, independentemente do grupo ( $p$  Momento  $< 0,001$ ).

**Tabela 3 - Descrição dos passos e acertos dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações**

Variável	Momento			p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré-op.	3 semanas	6 semanas			
<b>Passos</b>				0,698	<b>&lt;0,001</b>	0,404
Lesão + CT imediato						
Média ± DP	46,38 ± 1,92	1,63 ± 2,26	1,63 ± 3,11			
Mediana (mín.; máx.)	47 (43; 48)	0 (0; 5)	0 (0; 8)			
Lesão + CT 7 dias						
Média ± DP	46,5 ± 1,69	1,63 ± 2,39	4,5 ± 3,63			
Mediana (mín.; máx.)	47 (44; 49)	0 (0; 6)	4 (0; 10)			
Lesão + Soro fisiológico						
Média ± DP	46,75 ± 1,98	0 ± 0	3,25 ± 4,77			
Mediana (mín.; máx.)	47,5 (43; 49)	0 (0; 0)	0 (0; 12)			
Lesão						
Média ± DP	46,5 ± 1,2	0 ± 0	4 ± 5,66			
Mediana (mín.; máx.)	46,5 (45; 48)	0 (0; 0)	0 (0; 12)			
Sham						
Média ± DP	44,75 ± 1,49	44,75 ± 1,49	46,75 ± 1,39			
Mediana (mín.; máx.)	44,5 (43; 47)	44,5 (43; 47)	47 (45; 49)			
<b>Acertos</b>				0,567	<b>&lt;0,001</b>	0,158
Lesão + CT imediato						
Média ± DP	45,62 ± 1,85	1 ± 1,41	1,13 ± 2,23			
Mediana (mín.; máx.)	46 (43; 48)	0 (0; 3)	0 (0; 6)			
Lesão + CT 7 dias						
Média ± DP	45,38 ± 1,06	1 ± 1,41	3,38 ± 3,16			
Mediana (mín.; máx.)	45 (44; 47)	0 (0; 3)	2 (0; 8)			
Lesão + Soro fisiológico						
Média ± DP	45,63 ± 1,51	0 ± 0	2,38 ± 3,46			
Mediana (mín.; máx.)	45,5 (43; 48)	0 (0; 0)	0 (0; 8)			
Lesão						
Média ± DP	45 ± 1,07	0 ± 0	3,62 ± 5,15			
Mediana (mín.; máx.)	45 (44; 47)	0 (0; 0)	0 (0; 11)			
Sham						
Média ± DP	43 ± 1,69	43 ± 1,69	46 ± 1,31			
Mediana (mín.; máx.)	43 (40; 45)	43 (40; 45)	46 (44; 48)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos; \* Mesmo modelo com número de passos como limitador dos acertos; o grupo Sham não foi utilizado nas análises.

**Tabela 4 - Descrição dos escorregões e erros dos animais segundo grupos e momentos de avaliação e resultado das comparações**

Variável	Momento			p Grupo	p Momento	p Interação
	Pré-op.	3 semanas	6 semanas			
<b>Escorregões</b>				0,817	<b>&lt;0,001</b>	0,411
Lesão + CT imediato						
Média ± DP	0,75 ± 0,71	0,25 ± 0,46	0,25 ± 0,46			
Mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 1)	0 (0; 1)			
Lesão + CT 7 dias						
Média ± DP	0,88 ± 0,84	0,5 ± 0,76	0,75 ± 0,46			
Mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 2)	1 (0; 1)			
Lesão + Soro fisiológico						
Média ± DP	1 ± 0,76	0 ± 0	0,38 ± 0,74			
Mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	0 (0; 2)			
Lesão						
Média ± DP	1,13 ± 0,64	0 ± 0	0,25 ± 0,46			
Mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	0 (0; 0)	0 (0; 1)			
Sham						
Média ± DP	0,88 ± 0,64	0,88 ± 0,64	0,75 ± 0,71			
Mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	1 (0; 2)	1 (0; 2)			
<b>Erros</b>				0,656	<b>&lt;0,001</b>	0,388
Lesão + CT imediato						
Média ± DP	0 ± 0	0,38 ± 0,74	0,25 ± 0,46			
Mediana (mín.; máx.)	0 (0; 0)	0 (0; 2)	0 (0; 1)			
Lesão + CT 7 dias						
Média ± DP	0,25 ± 0,46	0,13 ± 0,35	0,38 ± 0,52			
Mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	0 (0; 1)	0 (0; 1)			
Lesão + Soro fisiológico						
Média ± DP	0,13 ± 0,35	0 ± 0	0,5 ± 0,76			
Mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 2)			
Lesão						
Média ± DP	0,38 ± 0,52	0 ± 0	0,13 ± 0,35			
Mediana (mín.; máx.)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 1)			
Sham						
Média ± DP	0,88 ± 0,64	0,88 ± 0,64	0 ± 0			
Mediana (mín.; máx.)	1 (0; 2)	1 (0; 2)	0 (0; 0)			

EEG com distribuição normal e função de ligação identidade, assumindo matriz de correlações AR(1) entre os momentos com número de passos como limitador dos escorregões e erros; o grupo Sham não foi utilizado nas análises.

A Tabela 5 mostra que, o número de passos diminuiu em média do pré para os demais momentos, mas aumentou de 3 para 6 semanas independente do grupo ( $p < 0,001$ ), os escorregões e erros aumentaram em média estatisticamente do pré para os demais momentos em todos os grupos, mas diminuíram de 3 para 6 semanas ( $p < 0,05$ ), já os acertos apenas aumentaram em média do pré para 3 semanas independente do grupo ( $p < 0,001$ ), lembrando que os resultados de acertos, escorregões e erros é relativo ao número de passos.

**Tabela 5 - Resultado das comparações múltiplas dos passos, acertos, escorregões e erros entre os momentos avaliados**

Variável	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Passos	Pré - 3 semanas	45,72	0,67	<0,001	44,11	47,32
	Pré - 6 semanas	43,19	0,72	<0,001	41,47	44,90
	3 semanas - 6 semanas	-2,53	0,67	<0,001	-4,14	-0,93
Acertos (%)	Pré - 3 semanas	-0,81	0,20	<0,001	-1,30	-0,32
	Pré - 6 semanas	-0,41	0,22	0,184	-0,93	0,11
	3 semanas - 6 semanas	0,41	0,20	0,138	-0,08	0,89
Escorregões (%)	Pré - 3 semanas	-44,97	0,60	<0,001	-46,41	-43,53
	Pré - 6 semanas	-42,66	0,64	<0,001	-44,18	-41,13
	3 semanas - 6 semanas	2,31	0,60	<0,001	0,88	3,75
Erros (%)	Pré - 3 semanas	-45,66	0,63	<0,001	-47,16	-44,16
	Pré - 6 semanas	-43,31	0,66	<0,001	-44,89	-41,73
	3 semanas - 6 semanas	2,34	0,63	0,001	0,84	3,84

Comparações múltiplas de Bonferroni.

## 5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os dois grupos tratados com células-tronco mostraram diminuição estatisticamente significativa nos graus de necrose, hemorragia e degeneração, quando comparados com os grupos controle.

Pela Tabela 6, tem-se que os níveis de necrose, hemorragia e degeneração foram estatisticamente diferentes entre os grupos ( $p < 0,05$ ), o grau de hiperemia e infiltrado não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p = 0,062$  e  $p = 0,090$  respectivamente).

**Tabela 6 - Descrição dos parâmetros histológicos segundo grupos e resultado das comparações**

Variável	Grupo					p
	CT Imediato	CT 7 dias	Lesão + SF	Lesão	Sham	
<b>Necrose</b>						<0,001
Ausente	8 (100)	8 (100)	0 (0)	0 (0)	8 (100)	
Discreto	0 (0)	0 (0)	8 (100)	8 (100)	0 (0)	
<b>Hemorragia</b>						0,001
Ausente	6 (75)	6 (75)	0 (0)	1 (12,5)	6 (75)	
Discreto	2 (25)	2 (25)	6 (75)	7 (87,5)	2 (25)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	
<b>Hiperemia</b>						0,062
Ausente	5 (62,5)	5 (62,5)	2 (25)	6 (75)	5 (62,5)	
Discreto	3 (37,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	0 (0)	3 (37,5)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	3 (37,5)	2 (25)	0 (0)	
Intenso	0 (0)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	
<b>Degeneração</b>						<0,001
Ausente	8 (100)	8 (100)	0 (0)	0 (0)	8 (100)	
Discreto	0 (0)	0 (0)	5 (62,5)	5 (62,5)	0 (0)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	3 (37,5)	3 (37,5)	0 (0)	
<b>Infiltrado</b>						0,090
Ausente	8 (100)	8 (100)	5 (62,5)	7 (87,5)	8 (100)	
Discreto	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	
Moderado	0 (0)	0 (0)	2 (25)	1 (12,5)	0 (0)	

Teste Kruskal-Wallis; o grupo Sham (grupo 5) não entrou nas análises.

A Tabela 7 mostra que os graus de necrose, hemorragia e degeneração foram estatisticamente maiores nos grupos lesão + soro fisiológico e apenas lesão em comparação aos grupos lesão + CT imediato e lesão + CT 7 dias ( $p < 0,05$ ).



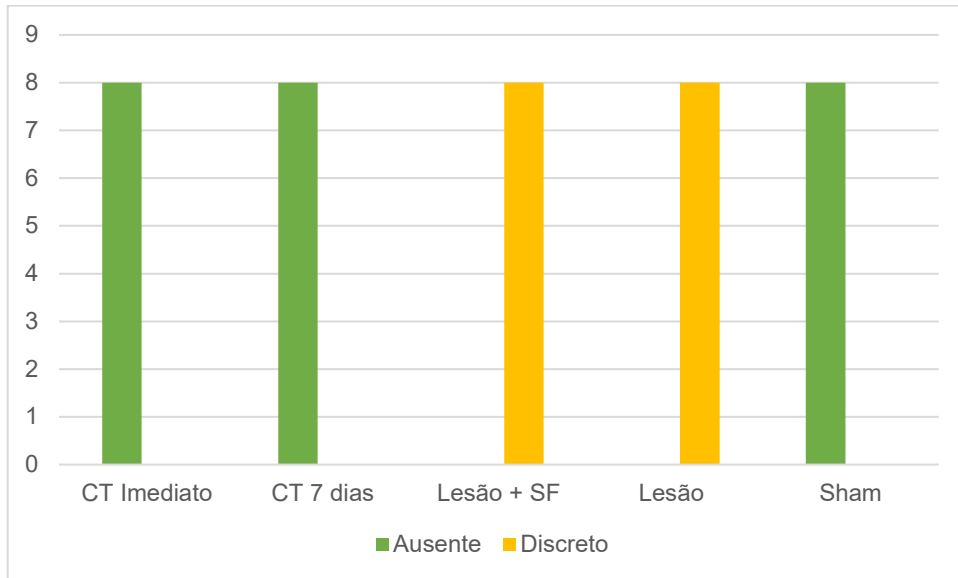
**Tabela 7 - Resultado das comparações múltiplas entre os grupos dos parâmetros histológicos que diferiram entre os grupos**

Variável	Comparação		Valor Z	p
Necrose	Lesão + CT imediato VS	Lesão + CT 7 dias	0,00	>0,999
	Lesão + CT imediato VS	Lesão + Soro fisiológico	3,52	<0,001
	Lesão + CT imediato VS	Lesão	3,52	<0,001
	Lesão + CT 7 dias VS	Lesão + Soro fisiológico	3,52	<0,001
	Lesão + CT 7 dias VS	Lesão	3,52	<0,001
	Lesão + Soro fisiológico VS	Lesão	0,00	>0,999
Hemorragia	Lesão + CT imediato VS	Lesão + CT 7 dias	0,93	0,350
	Lesão + CT imediato VS	Lesão + Soro fisiológico	3,00	0,003
	Lesão + CT imediato VS	Lesão	3,00	0,003
	Lesão + CT 7 dias VS	Lesão + Soro fisiológico	2,06	0,039
	Lesão + CT 7 dias VS	Lesão	2,06	0,039
	Lesão + Soro fisiológico VS	Lesão	0,00	>0,999
Degeneração	Lesão + CT imediato VS	Lesão + CT 7 dias	0,00	>0,999
	Lesão + CT imediato VS	Lesão + Soro fisiológico	3,52	<0,001
	Lesão + CT imediato VS	Lesão	3,52	<0,001
	Lesão + CT 7 dias VS	Lesão + Soro fisiológico	3,52	<0,001
	Lesão + CT 7 dias VS	Lesão	3,52	<0,001
	Lesão + Soro fisiológico VS	Lesão	0,00	>0,999

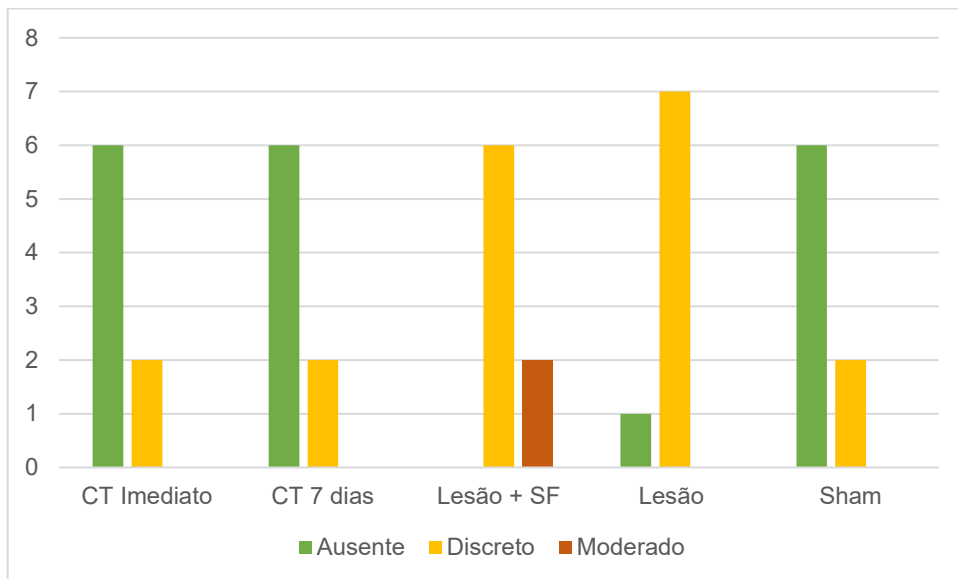
Comparações múltiplas de Dunn.

Os Gráficos 3, 4 e 5 representam as disparidades nos níveis de necrose, hemorragia e degeneração identificados nos diferentes grupos. Os grupos submetidos a intervenção exibiram características histológicas análogas às do grupo Sham, evidenciando a ausência de detecção de necrose ou degeneração, além de uma ausência ou ocorrência discreta de hemorragia, em contraste com os grupos de controle.

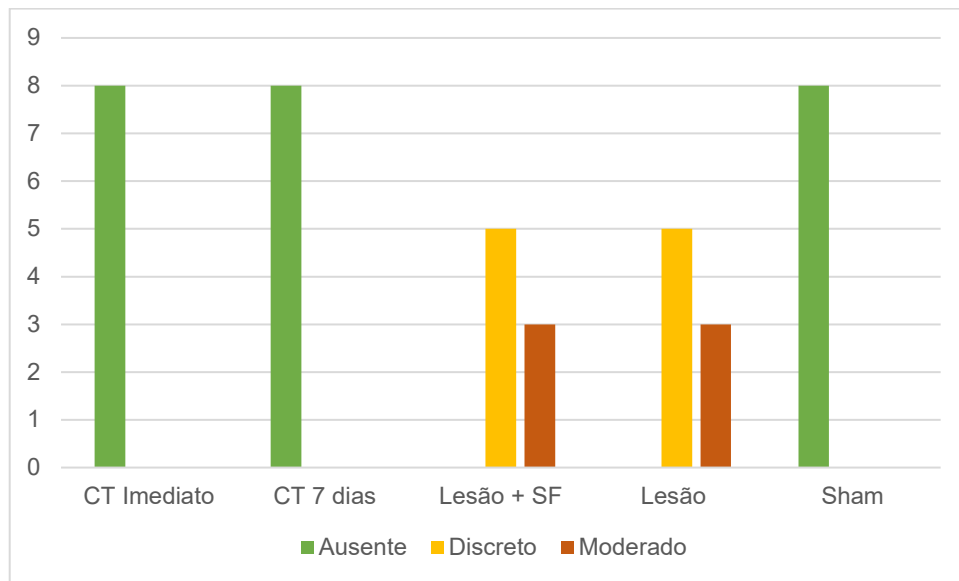
**Gráfico 3 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de necrose**



**Gráfico 4 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de hemorragia**

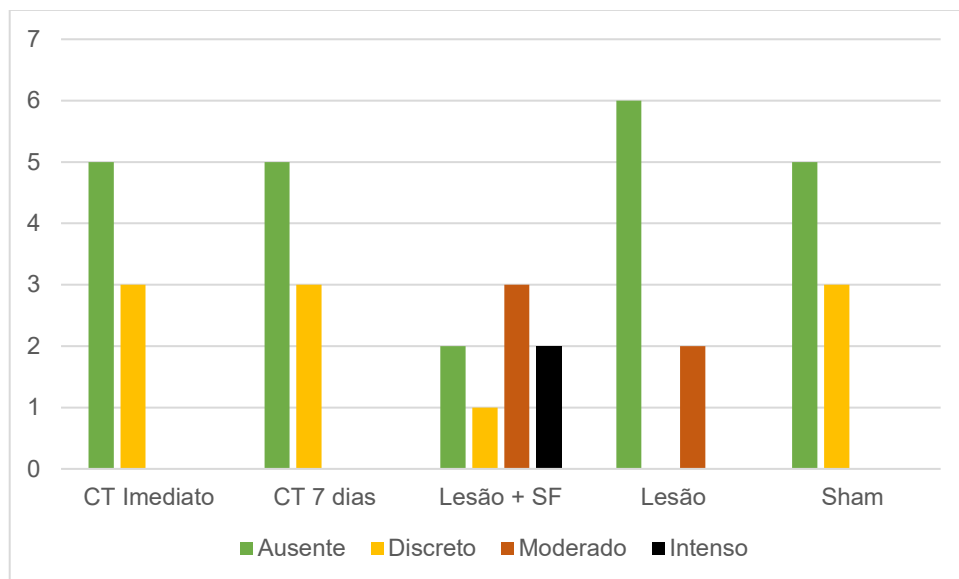


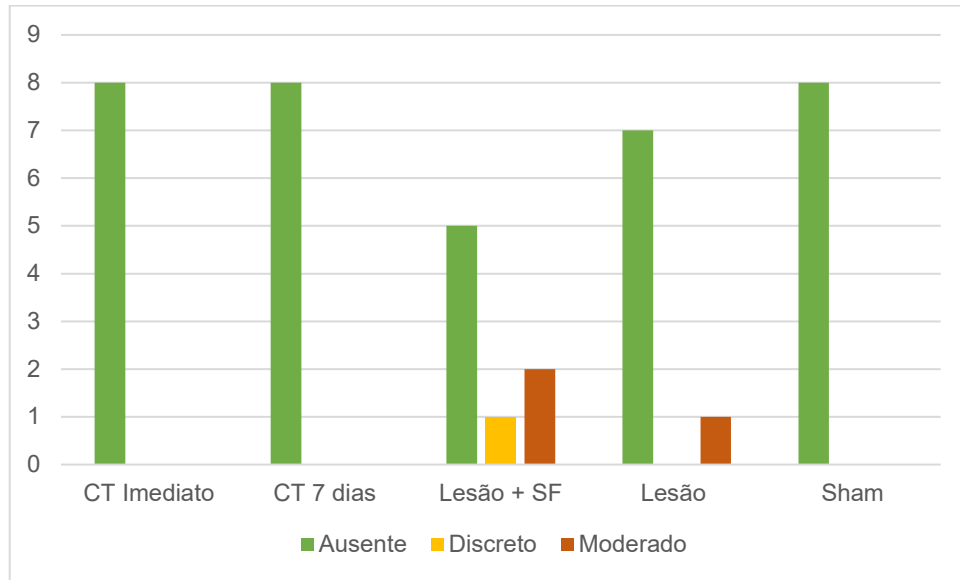
**Gráfico 5 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de degeneração**



Os Gráficos 6 e 7 evidenciam a ausência de diferenças significativas entre os grupos em relação aos níveis de hiperemia e infiltração nos cortes histológicos.

**Gráfico 6 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de hiperemia**



**Gráfico 7 - Análise histológica dos grupos quanto ao grau de infiltrado**

## **6 DISCUSSÃO**

O traumatismo raquimedular é uma condição devastadora que resulta em danos irreversíveis à medula espinhal, levando a deficiências motoras e sensoriais significativas. Historicamente, o tratamento dessa lesão foi desafiador, com altas taxas de mortalidade e limitadas opções terapêuticas para promover a recuperação neuronal. No entanto, avanços recentes na pesquisa com células-tronco têm despertado um grande interesse no campo da medicina regenerativa como uma possível abordagem promissora para o tratamento do traumatismo raquimedular.

O presente estudo seguiu um desenho experimental controlado, visando investigar os impactos do tratamento em camundongos da linhagem Balb C submetidos a uma lesão medular experimental de moderada gravidade. A fisiopatologia das cicatrizes gliais e cistos resultantes do TRM em roedores é semelhante à dos seres humanos, ao mesmo tempo em que é menos dispendiosa e mais padronizada, tornando-os os modelos animais de TRM mais amplamente utilizados até o momento<sup>(5)</sup>. Além disso, a utilização de camundongos da linhagem Balb C tem sido uma prática estabelecida pelo Laboratório de Estudos do Traumatismo Raquimedular e Nervos há bastante tempo, o que resultou em um processo mais seguro e com menor incidência de complicações.

As lesões foram causadas seguindo o protocolo internacional MASCIS, usando o *NYU Impactor*, que é um modelo globalmente reproduzido e regularmente empregado pelo LETRAN. Esse modelo oferece a vantagem de criar uma lesão contusa controlada que simula o principal mecanismo dos traumas em humanos e já foi validado para uso em camundongos<sup>(15)</sup>.

A opção pelas células-tronco do sangue do cordão umbilical foi motivada por uma série de benefícios que essas células oferecem. Isso inclui sua obtenção por métodos não invasivos que não causam danos à mãe ou ao bebê. Além disso, as células-tronco do sangue do cordão umbilical são menos desenvolvidas em comparação com as células mesenquimais adultas, o que facilita sua expansão em cultura e aumenta seu potencial de diferenciação. Adicionalmente, essas células demonstram baixa imunogenicidade, diminuindo o risco de doença enxerto-versus-hospedeiro. Isto ocorre, em parte, devido à sua baixa expressão de HLA-ABC e à ausência de expressão de HLA-DR, bem como a uma menor presença de antígenos coestimulatórios, como CD40, CD80 e CD86<sup>(56)</sup>.

Foram observados resultados positivos no que diz respeito aos parâmetros histológicos, sendo identificadas melhorias significativas nos grupos submetidos ao tratamento com células-tronco. Em particular, os graus de necrose, hemorragia e degeneração mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos grupos de controle, ou seja, aqueles que receberam apenas soro fisiológico e os que sofreram apenas a lesão medular ( $p < 0,05$ ). Esses achados mostraram que a administração de células-tronco teve um impacto positivo na histologia das amostras, como é possível observar nas Tabelas 6 e 7.

A análise dos cortes histológicos utilizando a coloração de hematoxilina e eosina possui algumas limitações inerentes; no entanto, oferece contribuições significativas para o entendimento das mudanças decorrentes do traumatismo raquimedular em modelos de roedores. Em 2018, Borges et al.<sup>(15)</sup> conduziram um estudo para padronizar a lesão medular em camundongos da linhagem Balb C, utilizando o protocolo MASCIS associado ao *NYU Impactor*. Durante o estudo, os pesquisadores observaram uma correlação positiva entre os diferentes graus de lesão e os achados motores e histológicos (principalmente dos graus de hiperemia, degeneração e infiltrado celular), os quais foram analisados por meio da coloração com hematoxilina e eosina. Na presente pesquisa, foram observadas melhorias significativas nos níveis de necrose, hemorragia e degeneração nos grupos submetidos à intervenção. No entanto, não foram observadas diferenças no grau de infiltrado celular e hiperemia, além disso, não se identificou correlação positiva entre a melhora dos achados histológicos e a melhora dos parâmetros funcionais nesses grupos.

Com relação à avaliação funcional, foi observada diferença estatisticamente relevante nas escalas BMS e MFS com relação aos momentos de avaliação, mostrando uma recuperação motora parcial dos camundongos ao longo das semanas (Tabelas 1 e 2). Este mesmo resultado, com diferenças relevantes nos diferentes momentos da avaliação, também foi encontrado na avaliação do plano horizontal (Tabela 5). Por outro lado, não foi possível constatar diferenças significativas entre os diferentes grupos na avaliação por meio das escalas BMS, MFS (Gráficos 1 e 2) e no teste do plano horizontal (Tabelas 3 e 4). A ausência de distinção entre os grupos submetidos ao tratamento e os grupos de controle sugere que, embora tenha havido melhorias histológicas decorrentes do tratamento celular, essas melhorias não se refletiram em ganhos funcionais significativos, conforme avaliado pelas escalas e testes utilizados ao término das 6 semanas de avaliação.

Apesar deste estudo não ter demonstrado melhora funcional nos grupos que sofreram a intervenção em comparação com os controles, existem estudos experimentais na literatura que mostram uma melhora funcional de roedores submetidos ao tratamento celular na fase aguda e subaguda.

Em 2022, Shang et al.<sup>(5)</sup> realizaram uma abrangente metanálise que englobou estudos experimentais envolvendo lesões medulares traumáticas em ratos. O principal objetivo desse estudo foi aprofundar o entendimento acerca dos fatores críticos para a terapia de reparação após TRM, incluindo o tipo celular utilizado, a dose administrada, a via de aplicação e o momento mais propício para o transplante. Os resultados obtidos nessa análise revelaram que as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo se destacaram como o tipo celular com o mais elevado potencial terapêutico para o tratamento de lesões medulares. Notavelmente, doses mais elevadas de células-tronco, especialmente aquelas iguais ou superiores a  $1 \times 10^6$ , demonstraram proporcionar efeitos terapêuticos mais significativos. Além disso, foi observado que o momento mais apropriado para o transplante celular ocorre durante a fase subaguda da lesão medular. Nesse cenário, o método de transplante intralesional se destacou como a abordagem mais vantajosa, sugerindo que a administração direta das células-tronco no local da lesão oferece benefícios substanciais em comparação com outras vias de administração.

Utilizou-se a administração perilesional epidural como via de aplicação de células neste estudo. Esta via de administração pode enfrentar limitações na penetração no SNC devido à presença da barreira hematoencefálica. Essa barreira é constituída por células endoteliais estreitamente interconectadas que formam uma barreira física ao longo dos capilares que fornecem sangue para o cérebro. Embora a barreira hematoencefálica permita a passagem de nutrientes essenciais, sua permeabilidade é restrita a muitas substâncias, incluindo medicamentos que necessitam atingir o SNC, contribuindo para manter a homeostase do cérebro e da medula espinhal<sup>(57,58)</sup> Uma estratégia para contornar essa limitação é a administração direta no líquido cefalorraquidiano que envolve o cérebro ou a medula espinhal, onde a difusão no cérebro é menos restrita<sup>(58)</sup>.

Em modelos de roedores, a administração direta de fluidos no SNC tem sido realizada por meio de injeções intracerebroventriculares e injeções intratecais, seja via cisterna magna ou região lombar. O maior tamanho dos ratos facilita a realização desses procedimentos nessa espécie, enquanto a administração direta no SNC



geralmente é mais desafiadora em camundongos, devido aos maiores riscos de lesão neurológica e erros no momento da administração em virtude das menores dimensões anatômicas das estruturas<sup>(58)</sup>.

Existem trabalhos analisando rotas periféricas de transplante com células-tronco, revelando que algumas delas têm a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer efeitos benéficos no cérebro, como no caso de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano, que demonstraram melhorar a doença de Alzheimer em modelos murinos. Além disso, células da medula óssea humana também podem entrar no cérebro e gerar neurônios, mas há indícios de falha nas células-tronco de cordão umbilical humano e células da medula óssea hematopoiéticas nesse aspecto. A sobrevivência desses enxertos no cérebro está associada à recuperação de déficits neurológicos, mas em algumas situações, os fatores terapêuticos secretados pelas células-tronco podem ser eficazes mesmo sem a necessidade de sua entrada no cérebro. Entretanto, essa terapia tem uma janela terapêutica restrita, resultando em benefícios limitados em doenças crônicas<sup>(57)</sup>.

Saporta et al.<sup>(59)</sup> conduziram um estudo experimental em 2003 envolvendo ratos submetidos a trauma raquimedular. Neste estudo, células mononucleares do sangue do cordão umbilical humano foram transplantadas por via intravenosa sistêmica com 1 dia ou 5 dias após a ocorrência da lesão medular. Os autores observaram que o grupo que recebeu o transplante de células mononucleares 5 dias após o TRM demonstrou uma melhora significativa nas pontuações locomotoras em comparação com o grupo tratado após 1 dia e o grupo de controle. Esses resultados sugeriram que a aplicação intravenosa das células durante o estágio subagudo pode oferecer benefícios superiores na reversão do quadro clínico. Além disso, a presença das células na região lesionada corroborou a hipótese de que a infusão sistêmica manteve a capacidade de migração das células e contribuiu para a recuperação da disfunção neurológica. Entretanto, a maioria das células-tronco transplantadas de forma intravenosa sofre retenção pulmonar após administração, resultando em uma migração limitada para o local da lesão. Isso resulta em uma restrição significativa na quantidade de células que efetivamente atingem o local da lesão, o que, por sua vez, pode limitar sua eficácia na promoção da reparação tecidual<sup>(5)</sup>.

A abertura transitória e seletiva da barreira hematoencefálica, com o intuito de viabilizar a penetração de terapias biológicas de caráter terapêutico, poderia efetivamente contribuir para os mecanismos de regeneração SNC. Algumas

estratégias têm sido desenvolvidas com o propósito de romper essa barreira, permitindo assim a entrada de agentes terapêuticos no SNC, uma vez que moléculas com massa molecular superior a 400 daltons normalmente encontram dificuldades para transpô-la<sup>(57)</sup>.

Um exemplo de estratégia descrita para abrir temporariamente a barreira é a utilização do manitol como adjuvante em infusões venosas. O manitol é um agente extracelular hiperosmolar utilizado para controlar a pressão intracraniana após lesões cerebrais, reduzindo o edema cerebral. Ele age induzindo um movimento de fluidos impulsionado pela osmolaridade do tecido cerebral para o espaço intravascular. Isso causa a contração das células endoteliais e estica as junções apertadas entre elas, aumentando a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Essa permeabilização é explorada como um sistema de entrega de medicamentos e terapias biológicas no SNC<sup>(57)</sup>.

Neste estudo as células-tronco foram administradas diretamente sobre a lesão na fase aguda e subaguda do TRM. Nestas fases ocorre uma ruptura da microcirculação local, acompanhada de um processo inflamatório intenso que afeta a barreira hematoencefálica<sup>(7)</sup>. Por outro lado, as unidades de sangue do cordão umbilical foram criopreservadas em uma solução contendo 10% de DMSO e plasma autólogo. O dimetilsulfóxido é um subproduto da indústria madeireira que tem sido utilizado como solvente comercial desde 1953. O DMSO é uma molécula anfipática com um domínio altamente polar e dois grupos apolares, o que o torna solúvel tanto em meios aquosos quanto orgânicos. A penetração na maioria das membranas teciduais ocorre em questão de minutos devido a uma alteração reversível na configuração das proteínas quando o DMSO substitui a água<sup>(60)</sup>. Este agente também é utilizado como crioprotetor intracelular de escolha, porém pode apresentar efeitos citotóxicos ao ser aquecido.

Existe uma discussão na literatura quanto à capacidade do DMSO de aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Kleindienst et al.<sup>(60)</sup> demonstraram em um modelo experimental de lesão isquêmica após a oclusão da artéria cerebral média em ratos Sprague-Dawley, que o DMSO usado como solvente aumentou a permeabilidade da barreira hematoencefálica, o que aumentou o acesso de medicamentos ao espaço extracelular do cérebro, mas também possivelmente intensificou o desenvolvimento de edema cerebral vasogênico.

A combinação dos eventos de fase aguda com a presença, mesmo que em pequenas quantidades, de DMSO utilizado na criopreservação das células-tronco mononucleares do SCUP, podem tornar a barreira hematoencefálica mais suscetível à penetração das células administradas no local da lesão ou mesmo dos fatores neurotróficos produzidos pelas células. A melhora do grau de necrose, hemorragia e degeneração observada nos grupos tratados reforça a influência que estas células desempenharam no local da lesão.

Nesta pesquisa, foram empregadas células-tronco mononucleares do cordão umbilical, que são principalmente associadas à regeneração do sistema sanguíneo hematopoiético. O principal objetivo foi investigar o potencial dessas células na regeneração do tecido nervoso. Estas células podem melhorar a recuperação após a lesão medular por meio de múltiplos mecanismos, incluindo secreção de citocinas anti-inflamatórias, liberação de fatores de crescimento, regulação positiva de metaloproteinases de matriz, regulação negativa do ativador de plasminogênio tecidual, prevenção da apoptose e aumento da angiogênese<sup>(45,61-64)</sup>. Apesar disso, grande parte dos estudos envolvendo o tratamento do trauma raquimedular com células do cordão umbilical utiliza as células-tronco mesenquimais.

Em um estudo conduzido por Ryabov et al.<sup>(65)</sup>, em 2020, ratos da linhagem Sprague-Dawley com lesões medulares graves foram submetidos a tratamento com células-tronco mononucleares do cordão umbilical humano, administradas 1 dia após o trauma. As células foram aplicadas tanto por via intravenosa quanto intralésional, ambas na concentração de  $2 \times 10^6$ . Os resultados indicaram melhorias funcionais e histológicas em comparação com o grupo controle.

Rodrigues et al.<sup>(66)</sup> demonstraram que o tratamento com células mononucleares do sangue do cordão umbilical humano foi capaz de promover a recuperação funcional em ratos Wistar submetidos a uma contusão na medula espinhal, quando administradas tanto na cisterna magna quanto diretamente no local da lesão, em uma concentração de  $5 \times 10^6$ . Embora ambos os grupos tratados 1 hora ou 9 dias após a lesão tenham mostrado melhora na função motora dos membros posteriores o melhor desempenho foi observado no grupo tratado na fase aguda, cuja melhora já era evidente a partir da segunda semana após o transplante. Os resultados da imunofluorescência identificaram células transplantadas que expressavam o anticorpo específico para humanos no local da lesão embora não tenha havido diferenciação das células-tronco em células neurais ou da glia.

Em 2018, Ryabov et al.<sup>(67)</sup> conduziram um estudo experimental no qual investigaram a eficácia da combinação de células-tronco mononucleares do cordão umbilical com uma matriz de colágeno tipo I no contexto de uma ressecção de segmento da medula espinhal em ratos adultos da linhagem Sprague-Dawley. Os resultados deste estudo revelaram que o implante de colágeno líquido demonstrou uma capacidade de integração com o tecido da medula espinhal, angiogênese e colonização celular. Esse tipo de implante foi considerado promissor para iniciar o processo de restauração da função motora dos membros que foi comprometida devido à remoção do segmento da medula espinhal. Além disso, a administração intravenosa de células mononucleares do sangue do cordão umbilical humano acelerou significativamente o processo de recuperação da função motora e resultou em um aumento no volume de movimentos restaurados.

No contexto da lesão medular, o presente estudo sugere que as células-tronco mononucleares aplicadas sobre a lesão de camundongos Balb C, apresentam um papel mais limitado no tratamento das fases aguda e subaguda do TRM, sobretudo no que diz respeito à melhora funcional. Essas diferenças podem estar relacionadas às diferentes capacidades de diferenciação e propriedades intrínsecas desses tipos de células-tronco.

Apesar disso, é sabido que o potencial terapêutico das células-tronco não depende necessariamente da substituição de neurônios perdidos. É mais provável que o efeito benéfico das células-tronco ocorra porque as células transplantadas migram para a área da lesão e liberam substâncias que estimulam a regeneração do tecido nervoso ou ativam mecanismos de compensação e células-tronco naturais dentro do tecido do hospedeiro<sup>(66)</sup>. As células mononucleares do sangue do cordão umbilical humano implantadas podem ter estimulado uma resposta natural do organismo à lesão secundária, promovendo a regeneração e melhora de parâmetros histológicos.

A presente tese apresenta resultados que contribuem para o desenvolvimento de evidências no campo dos estudos sobre o uso de células-tronco em lesões medulares. A ausência de uma resposta funcional positiva nos grupos que sofreram a intervenção suscita reflexões, especialmente em relação à atuação das células-tronco empregadas. Os principais estudos que evidenciaram os benefícios do uso de células mononucleares do cordão umbilical em lesões medulares foram realizados em diferentes espécies de ratos. Os mecanismos de reparação neuronal em ratos são

mais semelhantes aos da espécie humana do que os observados em camundongos. Além disso, a maior facilidade de realizar a infusão intralésional das células em ratos, diretamente no espaço liquórico, pode amplificar os efeitos de substituição e regeneração, além dos efeitos parácrinos das células-tronco.

Uma outra limitação do estudo foi a escassez de métodos de análise adicionais. A utilização da imuno-histoquímica forneceria detalhes mais refinados sobre os resultados, possibilitando uma interpretação mais completa dos desfechos. Métodos de avaliação neurofisiológica, como a eletroneuromiografia, também poderiam enriquecer e aprimorar a interpretação dos resultados.

Apesar dessas limitações, este estudo apresenta informações valiosas para a compreensão do tema, contribuindo para o progresso científico nessa área e para o preenchimento de lacunas no conhecimento da terapia celular no traumatismo raquimedular.

## **7 CONCLUSÃO**

Este estudo evidenciou que as células-tronco mononucleares obtidas do sangue do cordão umbilical e placentário humano, quando administradas em camundongos Balb C imediatamente após o trauma ou após 7 dias do trauma raquimedular, não induziram uma melhora significativa na função motora. Entretanto, observou-se uma melhora nos parâmetros histológicos dos graus de necrose, hemorragia e degeneração em ambos os grupos que foram submetidos à intervenção.

## **REFERÊNCIAS\***

---

\* De acordo com Estilo Vancouver.



1. Bock T, Heller RA, Haubruck P, Raven TF, Pilz M, Moghaddam A, Biglari B. Pursuing More Aggressive Timelines in the Surgical Treatment of Traumatic Spinal Cord Injury (TSCI): A Retrospective Cohort Study with Subgroup Analysis. *J Clin Med*. 2021 Dec 20;10(24):5977.
2. Witiw CD, Fehlings MG. Acute Spinal Cord Injury. *J Spinal Disord Tech*. 2015 Jul;28(6):202-10.
3. Obara K, Shirai K, Hamada Y, Arakawa N, Yamane M, Takaoka N, Aki R, Hoffman RM, Amoh Y. Chronic spinal cord injury functionally repaired by direct implantation of encapsulated hair-follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells in a mouse model: Potential for clinical regenerative medicine. *PLoS One*. 2022 Jan 27;17(1):e0262755.
4. Park DH, Lee JH, Borlongan CV, Sanberg PR, Chung YG, Cho TH. Transplantation of umbilical cord blood stem cells for treating spinal cord injury. *Stem Cell Rev Rep*. 2011 Mar;7(1):181-94.
5. Shang Z, Wang R, Li D, Chen J, Zhang B, Wang M, Wang X, Wanyan P. Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Therapeutic Strategies Based on 15 Types of Stem Cells in Animal Models. *Front Pharmacol*. 2022 Mar 14;13:819861.
6. Ter Wengel PV, De Haan Y, Feller RE, Oner FC, Vandertop WP. Complete Traumatic Spinal Cord Injury: Current Insights Regarding Timing of Surgery and Level of Injury. *Global Spine J*. 2020 May;10(3):324-31.
7. Liao HY, Wang ZQ, Ran R, Zhou KS, Ma CW, Zhang HH. Biological Functions and Therapeutic Potential of Autophagy in Spinal Cord Injury. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Dec 20;9:761273.
8. Sterner RC, Sterner RM. Immune response following traumatic spinal cord injury: Pathophysiology and therapies. *Front Immunol*. 2023 Jan 6;13:1084101.
9. Antonios JP, Farah GJ, Cleary DR, Martin JR, Ciacci JD, Pham MH. Immunosuppressive mechanisms for stem cell transplant survival in spinal cord injury. *Neurosurg Focus*. 2019 Mar 1;46(3):E9.
10. Badhiwala JH, Wilson JR, Witiw CD, Harrop JS, Vaccaro AR, Aarabi B, Grossman RG, Geisler FH, Fehlings MG. The influence of timing of surgical decompression for acute spinal cord injury: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Neurol*. 2021 Feb;20(2):117-26.
11. de la Torre JC. Spinal cord injury models. *Prog Neurobiol*. 1984;22(4):289-344.
12. Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. *Exp Neurol*. 1992 Apr;116(1):40-51.

13. Torelli AG, Cristante AF, de Barros-Filho TEP, Dos Santos GB, Morena BC, Correia FF, Paschon V. Effects of ganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord injury in mice: Functional and immunohistochemical assessments. *Clinics (Sao Paulo)*. 2022 Feb 19;77:100006.
14. Bryda EC. The mighty mouse: the impact of rodents on advanced in biomedical research. *Missouri Medicina*. 2013;11(3):207-11.
15. Borges PA, Cristante AF, Barros-Filho TEP, Natalino RJM, Santos GBD, Marcon RM. Standardization of a spinal cord lesion model and neurologic evaluation using mice. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018 Mar 15;73:e293.
16. Singh R, Dhankar SS, Rohilla R. Quality of life of people with spinal cord injury in Northern India. *Int J Rehabil Res*. 2008 Sep;31(3):247-51.
17. Pearcey TE, Yoshida KK, Renwick RM. Personal relationships after a spinal cord injury. *Int J Rehabil Res*. 2007 Sep;30(3):209-19.
18. Chen T, Zhu J, Wang G, Sun J, Ma X, Tian L, Zhang M, Wang F, Yu Z. The global state of research in stem cells therapy for spinal cord injury (2003-2022): a visualized analysis. *Front Neurosci*. 2024 Jan 24;18:1323383.
19. Hu XC, Lu YB, Yang YN, Kang XW, Wang YG, Ma B, Xing S. Progress in clinical trials of cell transplantation for the treatment of spinal cord injury: how many questions remain unanswered? *Neural Regen Res*. 2021 Mar;16(3):405-13.
20. Yousefifard M, Nasser Maleki S, Askarian-Amiri S, Vaccaro AR, Chapman JR, Fehlings MG, Hosseini M, Rahimi-Movaghar V. A combination of mesenchymal stem cells and scaffolds promotes motor functional recovery in spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg Spine*. 2019 Nov 1;32(2):269-84.
21. Kalra K, Tomar PC. Stem cell: basics, classification and applications. *Am J of Phytomed Clinical Therapeutics*. 2019;2(7):919-30.
22. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10.
23. Smirnov VA, Radaev SM, Morozova YV, Ryabov SI, Yadgarov MY, Bazanovich SA, Lvov IS, Talypov AE, Grin' AA. Systemic Administration of Allogeneic Cord Blood Mononuclear Cells in Adults with Severe Acute Contusion Spinal Cord Injury: Phase 1/2a Pilot Clinical Study-Safety and Primary Efficacy Evaluation. *World Neurosurg*. 2022 May;161:e319-e338.
24. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Feb 26;10(1):68.
25. Jin MC, Medress ZA, Azad TD, Doulames VM, Veeravagu A. Stem cell therapies for acute spinal cord injury in humans: a review. *Neurosurg Focus*. 2019 Mar 1;46(3):E10.

26. Jarrige M, Frank E, Herardot E, Martineau S, Darle A, Benabides M, Domingues S, Chose O, Habeler W, Lorant J, Baldeschi C, Martinat C, Monville C, Morizur L, Ben M'Barek K. The Future of Regenerative Medicine: Cell Therapy Using Pluripotent Stem Cells and Acellular Therapies Based on Extracellular Vesicles. *Cells*. 2021 Jan 27;10(2):240.
27. Silvestro S, Bramanti P, Trubiani O, Mazzon E. Stem Cells Therapy for Spinal Cord Injury: An Overview of Clinical Trials. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 19;21(2):659.
28. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
29. Xu Y, Chen M, Zhang T, Ma Y, Chen X, Zhou P, Zhao X, Pang F, Liang W. Spinal cord regeneration using dental stem cell-based therapies. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2019;79(4):319-27.
30. Maillacheruvu PF, Engel LM, Crum IT, Agrawal DK, Peeples ES. From cord to caudate: characterizing umbilical cord blood stem cells and their paracrine interactions with the injured brain. *Pediatr Res*. 2018 Jan;83(1-2):205-13.
31. Ali H, Al-Mulla F. Defining umbilical cord blood stem cells. *Stem Cell Discovery*. 2012;02(01):15-23.
32. Abdullahi D, Annuar AA, Mohamad M, Aziz I, Sanusi J. Experimental spinal cord trauma: a review of mechanically induced spinal cord injury in rat models. *Rev Neurosci*. 2017 Jan 1;28(1):15-20.
33. Young W. MASCIS Spinal Cord Contusion Model. In: Chen J, Xu ZC, Xu XM, Zhang JH. (eds) *Animal Models of Acute Neurological Injuries*. Springer Protocols Handbooks: Humana Press. 2009. p. 411-21.
34. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 2006 May;23(5):635-59.
35. Farooque M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta Neuropathol*. 2000 Jul;100(1):13-22.
36. Bolton DA, Tse AD, Ballermann M, Misiaszek JE, Fouad K. Task specific adaptations in rat locomotion: runway versus horizontal ladder. *Behav Brain Res*. 2006 Apr 3;168(2):272-9.
37. Cummings BJ, Engesser-Cesar C, Cadena G, Anderson AJ. Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behav Brain Res*. 2007 Feb 27;177(2):232-41.

38. 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.
39. Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakraborty S, Holekamp TF, McDonald JW. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 23;97(11):6126-31.
40. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2003 Jun;181(2):115-29.
41. Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, Tada M, Sawada K, Iwasaki Y. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology.* 2003 Sep;23(3):169-80.
42. Koshizuka S, Okada S, Okawa A, Koda M, Murasawa M, Hashimoto M, Kamada T, Yoshinaga K, Murakami M, Moriya H, Yamazaki M. Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004 Jan;63(1):64-72.
43. Zhao ZM, Li HJ, Liu HY, Lu SH, Yang RC, Zhang QJ, Han ZC. Intraspinal transplantation of CD34+ human umbilical cord blood cells after spinal cord hemisection injury improves functional recovery in adult rats. *Cell Transplant.* 2004;13(2):113-22.
44. Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE, Gil MA, Salas E, Gardiner MC, Piccinelli G, Bossi S, Salas E, Petrelli L, Iorio G, Ramos CA, Soratti C. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant Proc.* 2005 Jan-Feb;37(1):292-4.
45. Kao CH, Chen SH, Chio CC, Lin MT. Human umbilical cord blood-derived CD34+ cells may attenuate spinal cord injury by stimulating vascular endothelial and neurotrophic factors. *Shock.* 2008 Jan;29(1):49-55.
46. Khodabandeh Z, Mehrabani D, Dehghani F, Gashmardi N, Erfanizadeh M, Zare S, Bozorg-Ghalati F. Spinal cord injury repair using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in mice: A stereological study. *Acta Histochem.* 2021 Jul;123(5):151720.
47. Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA. *Veterinary Anesthesia and Analgesia.* 5th ed. Wiley-Blackwell; 2015. p. 743-53.
48. Rodrigues NR, Letaif OB, Cristante AF, Marcon RM, Oliveira RP, Barros Filho TEP. Standardization of spinal cord injury in Wistar rats. *Acta Ortop Bras.* 2010; 18(4):182-6.

49. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, Anderson DK, Faden AI, Gruner JA, Holford TR, Hsu CY, Noble LJ, Nockels R, Perot PL, Salzman SK, Young W. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma*. 1996 Jul;13(7):343-59.
50. Santos GB, Cristante AF, Marcon RM, Souza FI, Barros Filho TEP, Damasceno ML. Spinal cord injury experimental model and motion evaluation protocol in Wistar rats. *Acta Ortop Bras*. 2011;19(2):87-91.
51. Salazar DL, Uchida N, Hamers FP, Cummings BJ, Anderson AJ. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in an early chronic spinal cord injury NOD-scid mouse model. *PLoS One*. 2010 Aug 18;5(8):e12272.
52. Salewski RP, Mitchell RA, Shen C, Fehlings MG. Transplantation of neural stem cells clonally derived from embryonic stem cells promotes recovery after murine spinal cord injury. *Stem Cells Dev*. 2015 Jan 1;24(1):36-50.
53. Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 4th ed. Academic Press; 2015.
54. Miranda TAB. *Estratégia terapêutica após contusão da medula espinhal: recuperação funcional e estabilidade cortical sensório-motora*. Tese (Doutorado em Fisiologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2011.
55. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1180:31-43.
56. Lee HJ, Kang KS, Kang SY, Kim HS, Park SJ, Lee SY, Kim KD, Lee HC, Park JK, Paik WY, Lee L, Yeon SC. Immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *J Vet Sci*. 2016 Sep 30;17(3):289-97.
57. Gonzales-Portillo GS, Sanberg PR, Franzblau M, Gonzales-Portillo C, Diamandis T, Staples M, Sanberg CD, Borlongan CV. Mannitol-enhanced delivery of stem cells and their growth factors across the blood-brain barrier. *Cell Transplant*. 2014;23(4-5):531-9.
58. Choi SE, Rahman A, Ayoub T, Botelho O, Lee G, Gazdzinski LM, Wheeler AL, Weksberg R, Guger SL, Schachar RJ, Ito S, Hitzler J, Nieman BJ. High-frequency ultrasound-guided intrathecal injections in a young mouse model: Targeting the central nervous system in drug delivery. *J Neurosci Methods*. 2023 Feb 15;386:109778.
59. Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR. Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003 Jun;12(3):271-8.

60. Kleindienst A, Dunbar JG, Glisson R, Okuno K, Marmarou A. Effect of dimethyl sulfoxide on blood-brain barrier integrity following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neurochir Suppl.* 2006;96:258-62.
61. Dasari VR, Veeravalli KK, Tsung AJ, Gondi CS, Gujrati M, Dinh DH, Rao JS. Neuronal apoptosis is inhibited by cord blood stem cells after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 2009 Nov;26(11):2057-69.
62. Dasari VR, Spomar DG, Li L, Gujrati M, Rao JS, Dinh DH. Umbilical cord blood stem cell mediated downregulation of Fas improves functional recovery of rats after spinal cord injury. *Neurochem Res.* 2008 Jan;33(1):134-49.
63. Veeravalli KK, Dasari VR, Tsung AJ, Dinh DH, Gujrati M, Fassett D, Rao JS. Human umbilical cord blood stem cells upregulate matrix metalloproteinase-2 in rats after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2009 Oct;36(1):200-12.
64. Chen CT, Foo NH, Liu WS, Chen SH. Infusion of human umbilical cord blood cells ameliorates hind limb dysfunction in experimental spinal cord injury through anti-inflammatory, vasculogenic and neurotrophic mechanisms. *Pediatr Neonatol.* 2008 Jun;49(3):77-83.
65. Ryabov SI, Zvyagintseva MA, Yadgarov MY, Bazanovich SA, Smirnov VA. Comparison of the Efficiency of Systemic and Local Cell Therapy with Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells in Rats with Severe Spinal Cord Injury. *Bull Exp Biol Med.* 2020 Feb;168(4):552-5.
66. Rodrigues LP, Iglesias D, Nicola FC, Steffens D, Valentim L, Witczak A, Zanatta G, Achaval M, Pranke P, Netto CA. Transplantation of mononuclear cells from human umbilical cord blood promotes functional recovery after traumatic spinal cord injury in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2012 Jan;45(1):49-57.
67. Ryabov SI, Zvyagintseva MA, Osidak EO, Smirnov VA. Collagen Implant and Mononuclear Cells of Umbilical Blood Allow the Restore of Movements of Hind Limbs after Removing the Site of Spinal Cord. *Bull Exp Biol Med.* 2018 Jan;164(3):390-3.

## **ANEXOS**

## Anexo A - Planilha para preenchimento da escala BMS

Camundongo: XX.

Grupo: XX.

Data: / /

BMS Scale	Score	Esquerdo	Direito	Média
Ausência de movimentos	0			
Tornozelo com movimento discreto	1			
Tornozelo com movimentos amplos	2			
Movimento óbvio dos membros posteriores	3			
Pisada dorsal	3			
Apoio pata	3			
Apoio pata plantar com peso	4			
Frequente e consistente passada plantar	5			
Menor que 50% de membro anterior e posterior coordenados e paralelos no contato inicial	5			
Menor que 50% de membro anterior e posterior coordenados com contato inicial e patas paralelas	6			
maior que 50% de membro anterior e posterior coordenados e patas rodadas	6			
maior que 50% de membro anterior e posterior coordenados e paralelos no contato inicial	7			
Patas paralelas e tronco estável	7			
Tronco estável e cauda 50% cima/50% baixo	8			
Moderada instabilidade de tronco	8			
Estabilidade normal e cauda sempre para cima	9			



### Anexo B - Planilha para preenchimento da escala MFS

Camundongo: XX.

Grupo: XX.

Data: / /

<b>MFS</b>	<b>Score</b>	<b>Esquerdo</b>	<b>Direito</b>	<b>Média</b>
Ausência de movimentos	<b>0</b>			
Movimentos ocasionais	<b>1</b>			
Óbvio movimento em 1 membro posterior	<b>2</b>			
Óbvio movimento em 2 membros posteriores	<b>3</b>			
Passada de 1 membro posterior	<b>4</b>			
Impulso com 2 membros posteriores	<b>5</b>			
Apoia o peso e não deambula	<b>6</b>			
Deambulação com patas rodadas	<b>7</b>			
Deambulação normal em baixa velocidade	<b>8</b>			
Barra 2 cm	<b>9</b>			
Barra 1,5 cm	<b>10</b>			
Barra 1 cm	<b>11</b>			
Barra 0,7 cm	<b>12</b>			
Barra 0,5 cm	<b>13</b>			

## Anexo C - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da injeção em dose única de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal, imediatamente e após 7 dias do trauma raquimedular, em Camundongos**”, registrada com o nº **1247/2019**, sob a responsabilidade de **Alexandre Fogaça Cristante e Alex Oliveira de Araujo**, apresentada pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 22.05.19

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 04-03-2019 Término: 01-10-2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/c
Nº total	50
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Bioterio Central da FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 22 de Maio de 2019

Dr. Eduardo Pompeu  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais

## Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal em Camundongos

(TCLE versão 1/ colocar data)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: .M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M  F
- DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
- ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
- BAIRRO: ..... CIDADE: .....
- CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação da injeção em dose única de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal, imediatamente e após 7 dias do trauma raquimedular em Camundongos**

PESQUISADOR: Alexandre Fogaça Cristante e Alex Oliveira Araújo  
 CARGO/FUNÇÃO: médico (a) INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: 90.738  
 UNIDADE DO HCFMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo / Instituto de Ortopedia e Traumatologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- |              |                          |             |                          |
|--------------|--------------------------|-------------|--------------------------|
| RISCO MÍNIMO | <input type="checkbox"/> | RISCO MÉDIO | <input type="checkbox"/> |
| RISCO BAIXO  | x                        | RISCO MAIOR | <input type="checkbox"/> |

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 14 meses

Rubrica do participante  
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

**Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal em Camundongos**

(TCLE versão 1/ colocar data)

**4 – 1 – Desenho do estudo e objetivo (s):**

O objetivo deste estudo, para o qual está sendo solicitada a coleta e processamento do sangue de cordão umbilical e placentário do seu bebê, é provar que a injeção de células tronco do sangue do cordão umbilical é capaz de auxiliar no tratamento de lesões na coluna espinhal de camundongos.

O estudo consiste em sua participação voluntária para autorizar a coleta e o processamento do sangue de cordão umbilical e placentário do seu bebê para que essas células sejam testadas no tratamento de animais submetidos a lesão da coluna vertebral. Os animais serão submetidos experimentalmente a uma lesão medular que simula a lesão espinhal ocorrida em seres humanos vítimas de acidentes que levam a paraplegia e tetraplegia.

Alguns estudos mostram que a injeção de células tronco no local da lesão, auxilia na recuperação dos animais. Nesse estudo, pretendemos testar também a quantidade de células e a frequência da infusão dessas células, para verificar se essas mudanças são capazes de reverter a lesão na coluna espinhal.

**2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados:**

O sangue de cordão umbilical e placentário do seu bebê será coletado por médicos e/ou enfermeiras, treinadas pela equipe da Cryopraxis, imediatamente após o nascimento. Esta coleta não traz risco nem para a mãe nem para o bebê, uma vez que é realizada em um material que rotineiramente costuma ser descartado segundo as normas sanitárias vigentes e o procedimento só é iniciado após o nascimento do bebê e sua entrega para os cuidados da equipe de pediatria. Após a coleta do sangue do cordão umbilical do bebê, a bolsa de coleta contendo o sangue de cordão umbilical e placentário será guardado em frascadeira térmica específica e transportado até o laboratório da Cryopraxis, com temperatura monitorada/registrada durante todo o trajeto. A seguir, ele será processado, congelado e enviado de volta ao Instituto de Ortopedia para utilização nos animais.

**3 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do item 2:**

Rubrica do participante  
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

**Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal em Camundongos**

(TCLE versão 1/ colocar data)

Para a coleta do sangue de cordão umbilical e placentário, não se identificam riscos ou desconfortos envolvidos nem para a mãe nem para o bebê. Os riscos para a equipe da pesquisa estão relacionados à contaminação com material biológico, inerentes aos cuidados com saúde, que são minimizados uma vez que o profissional responsável pela coleta dos materiais biológicos deverá estar protegido pelos equipamentos de proteção individual como os mesmos dispositivos de segurança usados pelos demais membros da equipe de saúde, como capote cirúrgico, gorro, máscara e luvas estéreis.

**4 – Benefícios para o participante:**

Não está previsto qualquer benefício imediato ao participante da pesquisa. O participante não terá o direito de manter as células tronco armazenadas no banco de células da Cryoprazis para uso próprio no futuro. Entretanto, o projeto se propõe a esclarecer os aspectos ainda desconhecidos, no modelo animal, da lesão da coluna espinhal em camundongos e poderá no futuro, oferecer alternativas de tratamento. Em atendimento às diretrizes previstas na Resolução CNS 441/11 e Portaria MS 2201/11, uma parte de sangue de cordão umbilical e placentário (amostra de referência) será mantida armazenada pelo período de duração do projeto, para garantia do acesso gratuito às informações associadas ao material biológico utilizado.

Decorrido os prazos descritos acima, o material será descartado segundo as normas de sanitárias vigentes e não será utilizado em outros projetos.

**5 – Garantia de acesso:** Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristate que pode ser encontrado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Rua Dr. Ovidio Pires de Campo, 333 – 2º andar, tel: 2661-6912. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000, horário de atendimento: 8:00-17:00h; Tel: (11) 3893-4401/4407 E-mail: [cep\\_fm@usp.br](mailto:cep_fm@usp.br)

Rubrica do participante  
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

**Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal em Camundongos**

(TCLE versão 1/ colocar data)

6 – Será garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

7 – Os senhores serão informados sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

8 – Não haverá despesas pessoais para os senhores em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Sua participação acaba após a coleta do sangue do cordão umbilical de seu filho.

9 – O pesquisador se compromete a utilizar os dados e os materiais coletados somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito dos dados que li ou que foram lidos para mim, descrevendo o estudo **“Avaliação da injeção em dose única de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal, imediatamente e após 7 dias do trauma raquimedular em Camundongos”**. Eu discuti com o **Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

10 - Garantia de indenização: O (A) senhor(a) tem direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Rubrica do participante  
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador

**Avaliação da aplicação de Células Tronco Obtidas de Cordão Umbilical na Lesão da Medula Espinhal em Camundongos**

(TCLE versão 1/ colocar data)

Assinatura do paciente/representante legal      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo      Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Rubrica do participante  
Da pesquisa

Rubrica do pesquisador