

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VIABILIDADE E SEGURANÇA DO TRANSPLANTE INTRATECAL DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS E ALOGÊNICAS
PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES (LUPUS CANIS FAMILIARIS)

FELIPE PÉREZ BENAVIDES

Botucatu – SP

Julho, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VIABILIDADE E SEGURANÇA DO TRANSPLANTE INTRATECAL DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS E ALOGÊNICAS
PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES (LUPUS CANIS FAMILIARIS)

FELIPE PÉREZ BENAVIDES

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins
Amorim.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda da
Cruz Landim e Alvarenga.

Ficha Catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Pérez Benavides, Felipe.

Viabilidade e segurança do transplante intratecal de células tronco mesenquimais autólogas e alogênicas provenientes da medula óssea de cães (*lupus canis familiaris*) / Felipe Pérez Benavides. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Rogério Martins Amorim

Coorientador: Fernanda da Cruz Landim E Alvarenga

Capes: 50501003

1. Transplante de Células-Tronco. 2. Células-Tronco. 3. Líquido cefalorraquidiano - Exame. 4. Medula óssea.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais ; Intratecal; Líquido cefalorraquidiano; Medula óssea; Metaloproteínas.

Nome do Autor: Felipe Pérez Benavides

Título: VIABILIDADE E SEGURANÇA DO TRANSPLANTE INTRATECAL DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS E ALOGÊNICAS PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES (LUPUS CANIS FAMILIARIS).

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Profª Drª Rosangela L. Dittrich

Membro

Departamento de Patologia Clínica Veterinária e Análises Clínicas e

Toxicológicas em Medicina Veterinária

FMVZ – UFPR - Curitiba

Prof.Dr. Juliane Gomes Quitzan

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 18 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Para meus pais, Fabio e Amada, por seu apoio e virtudes inculcadas.

Para minha família, por seu respaldo e confiança brindados.

Para minha namorada Diana, por estar sempre ao meu lado.

Para meus amigos, por sua força e alegria oferecidas.

A mis papás, Fabio y Amada, por su continuo apoyo y virtudes inculcadas.

A mi familia, por su respaldo y confianza brindadas.

A mi novia Diana, por estar siempre al lado mio.

A mis amigos, por su fuerza y alegria ofrecidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Rogério Martins Amorim, por brindar-me com a oportunidade de estudar no Brasil e ser meu orientador.

A Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga por colaborar e participar como co-orientadora da pesquisa.

A Prof^a. Dr^a Gisele Fabrino Machado e pós-graduando Guilherme Dias de Melo por sua cooperação com a elaboração da zimografia das MMP.

A Prof. Dr. Jose Pantoja por sua colaboração com a parte estatística.

A pós-graduanda Diana Milena Rodríguez, por seu apoio e respaldo incondicional.

As pós-graduandas Marta Heckler, Livia Ramos, Lidia Matsubara e residente Marina Monobe por sua colaboração no projeto.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade estadual paulista “Julio de Mesquita filho” (UNESP), Campus de Botucatu, SP, por facilitar suas instalações e departamentos para poder desenvolver o projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por oferecer a bolsa de estudo de mestrado.

A minha família e amigos por seu apoio e confiança brindados.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1 -	Medianas dos parâmetros utilizados no exame neurológico de cada grupo pré e pós-transplante. O: estado mental, NC: nervos craniais, RP: reações posturais, FU: função urinária, AS: avaliação sensitiva, PM: palpação/manipulação.....	42
Figura 2 -	Medianas das variáveis físico-químicas e citológicas mais representativas nos momentos 1 e 2 de todos os grupos....	43
Figura 3 -	Medianas das zimografias das MMP 2 e MMP9 latente e ativa pré e pós-transplante de CTM-MO em todos os grupos.....	44
Figura 4 -	Coloração histológica Oil red. Formação de gotículas de gordura (vermelho). 10X.....	45
Figura 5-	Coloração histológica Alizarim red. Formação de depósitos de cálcio (vermelho). 40X.....	45
Figura 6 -	Coloração histológica Alcian blue. Matriz cartilaginosa em azul. 10X.....	45
Figura 7	Citometria de fluxo do anticorpo CD 34 das CTM-MO.....	46
Figura 8	Citometria de fluxo dos anticorpos CD 44 e 105 das CTM-MO.....	46

LISTA DE ABREVIações

CT: célula-tronco.

CTM: células-tronco mesenquimais.

CTM-MO: células-tronco mesenquimais de medula óssea.

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's médium.

LCR: líquido cefalorraquidiano.

MMP: Metaloproteinase.

PBS: solução tampão fosfato- salina.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
CAPITULO 1	1
INTRODUÇÃO.....	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
CAPITULO 2	12
Trabalho científico: Viabilidade e segurança do transplante intratecal de células tronco mesenquimais autólogas e alogênicas provenientes da medula óssea de cães (lupus canis familiaris).	
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Material e métodos.....	31
Resultados.....	37
Discussão	38
Conclusões.....	41
Referências.....	47
CAPITULO 3	50
CONCLUSÕES GERAIS.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	52
ANEXOS.....	60

PÉREZ, F. Viabilidade e segurança do transplante intratecal de células tronco mesenquimais autólogas e alogênicas provenientes da medula óssea de cães (lupus canis familiaris). Botucatu, 2013. 69p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O trabalho teve por objetivo avaliar clínica e laboratorialmente a viabilidade e a segurança do transplante intratecal de células-tronco mesenquimais autólogas e alogênicas provenientes da medula óssea (CTM-MO) de cães. Foram utilizados 15 cães, sem raça definida, adultos, de ambos os sexos, clinicamente saudáveis, excetuando dois que apresentavam trauma medular crônico. Foram divididos em três grupos, contendo cinco animais cada. As CTM-MO foram obtidas pela punção da medula óssea, isoladas e cultivadas. O grupo A foi transplantado com CTM-MO autólogas por via intratecal através da cisterna magna, enquanto que o grupo B recebeu as CTM-MO alogênicas e o grupo C (controle) foi aplicado solução tampão fosfato-salina (PBS). O líquido cefalorraquidiano (LCR) foi obtido imediatamente antes do transplante das CTM-MO (momento 1) e no quinto dia após (momento 2), para avaliação físico-química, citológica e da concentração de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9). Todos os animais foram acompanhados por exame físico neurológico pré e pós-transplante. Pelas avaliações clínicas e laboratoriais, não se observaram alterações significativas após o transplante das CTM-MO autólogas e alogênicas por via intratecal, demonstrando ser uma via segura e viável para a utilização de terapia celular em cães.

Palavras-Chave: células-tronco mesenquimais de medula óssea, intratecal, metaloproteinases, líquido cefalorraquidiano.

PÉREZ, F. Viability and safety of intrathecal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells autologous and allogeneic of dogs (*canis lupus familiaris*). Botucatu, 2013. 69p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate clinical and laboratory viability and safety of intrathecal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSK) autologous and allogeneic of dogs. A total of 15 dogs, mixed breed, adults of both sexes, clinically healthy, except two who had chronic spinal trauma. They were divided into three groups with five animals each. BM-MSK were obtained by puncture of the bone marrow, isolated and cultured. Group A was transplanted with autologous BM-MSK intrathecally via the cisterna magna, while group B received allogeneic BM-MSK and group C (control) was administered phosphate buffered saline (PBS). Cerebrospinal fluid (CSF) was obtained immediately before transplantation of BM-MSK (moment 1) and the fifth day after (moment 2) for physico-chemical, cytological and the concentration of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9 .) All Animals were monitored by neurological examination before and after transplantation. By clinical and laboratory evaluations, no significant changes were observed after transplantation of BM-MSK autologous and allogeneic intrathecal, proving to be a safe and viable for the use of cell therapy in dogs.

Keywords: bone marrow mesenchymal stem cells, intrathecal, metalloproteinases, cerebrospinal fluid.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

As pesquisas sobre a biologia das células-tronco (CT) estão evoluindo cada vez mais na medicina humana e veterinária, começando a ser uma alternativa promissora para o tratamento de diversas enfermidades, dentre elas as neurológicas.

Em pequenos animais, os avanços no tratamento com células-tronco (CT) oferecem outra opção na terapêutica de diferentes tipos de doenças, como enfermidade articular degenerativa (BLACK *et al.*, 2007), não união óssea (Zamprogno, 2007), lesões medulares (LIM *et al.*, 2007), entre outras.

As CT podem ser definidas como células com grande capacidade de proliferação e auto-renovação, além da capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas (PEREIRA, 2008).

Quanto à origem, as CT podem ser classificadas em células-tronco embrionárias (CTE) e adultas (CTA). As CTE são derivadas do blastocisto e são consideradas totipotentes, ou seja, apresentam a capacidade de originar mais de 250 tipos diferentes de linhagens celulares. Já as CTA ou somáticas são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, a pele, o fígado, o coração, o cérebro (HAAS *et al.*, 2005), a medula óssea e o sangue do cordão umbilical e placenta (KIRSCHSTEIN e SKIRBOLL, 2001). Pesquisas desenvolvidas nos últimos anos resultaram na descoberta de uma grande variedade de tipos de células-tronco adultas. As hematopoiéticas (CTH), que originam todos os tipos de células sanguíneas, são as CTA conhecidas há mais tempo. Como a maioria das outras CTA, elas constituem uma pequena fração (0,01 - 0,1%) do total de células e não apresentam características morfológicas que as diferenciem das demais células, além de se dividirem em uma taxa muito baixa (NARDI, 2007). Entretanto, Sullivan (2005) ressalta que as CTA, uma vez coletadas do tecido de origem podem ser facilmente cultivadas e expandidas em laboratório.

Outros tipos de CTA incluem as epiteliais, as musculares, as neuronais e as mesenquimais, sendo que a plasticidade, ou seja, a capacidade de originar diferentes tipos de células maduras é muito elevada nas células-tronco mesenquimais (CTM) (NARDI, 2007).

A medula óssea adulta é considerada um reservatório tanto de CTH, como de CTM. As CTM atuam na regeneração de tecidos mesenquimais, tais como cartilagem, tendão e ligamento (WOO *et al.*, 1999; GAO e CAPLAN, 2003). As CTM possuem efeito parácrino com propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras (JIANG *et al.*, 2002) e podem sofrer transdiferenciação, ou seja, a capacidade de se transformar em células de distinto linhagem sob estímulos adequados, em células nervosas, incluindo neurônios e células da glia (HERMANN *et al.*, 2004; PHINNEY *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008).

Evidências recentes sugerem que as CTM migram seletivamente para áreas de lesão, inflamação e tumores, onde elas estão envolvidas na reparação tecidual e formação do estroma associado ao tumor (CHEN *et al.*, 2008). Esses efeitos tornam essas células candidatas atrativas como veículo para terapia em sítios específicos. O princípio da terapia com CTM além de restaurar a função de um tecido, através do transplante de células que irão substituir as células lesadas ou defeituosas promovendo o crescimento de um novo tecido (Zago, *et al.*, 2004), é também baseado na habilidade que estas células apresentam de modular a resposta inflamatória local (BORJESSON *et al.*, 2011).

Os cães são frequentemente acometidos por enfermidades neurológicas que quase sempre deixam sequelas que prejudicam a qualidade de vida do animal. As doenças neurológicas que mais comumente acometem os cães são as de origem inflamatória (meningoencefalomielite granulomatosa, meningoencefalomielite necrotizante, leucoencefalomielite necrotizante) traumáticas e vasculares (trauma medular agudo, acidente vascular cerebral, tromboembolismo fibrocartilaginoso), infecciosa (encefalites virais, bacterianas, protozoárias e fúngicas), neoplásica (neoplasias primárias e secundárias) e degenerativa (Síndrome da disfunção cognitiva, discopatia tipo II), entre outras.

Diante de uma considerável casuística de problemas neurológicos, a terapia com CTM intratecal pode ser de grande valia para a recuperação desses pacientes. A via utilizada para o transplante das CTM pode interferir diretamente no sucesso do tratamento. A via intratecal pode ser vantajosa, uma vez que é menos invasiva que a aplicação direta no tecido nervoso lesado e permite a passagem pela barreira hemato-encefálica.

Para se viabilizar a terapia celular na rotina clínica veterinária, além de pesquisas sobre o cultivo, vias de transplante e propriedades terapêuticas das CTM, faz-se necessário a criação de bancos de células para uso imediato nos pacientes. Nesse sentido estudos com CTM alogênicas devem ser realizados para estabelecer a segurança desse tipo de transplante.

REVISÃO DE LITERATURA

Células-tronco mesenquimais

O termo célula-tronco foi criado no século XIX por Edmund Beecher Wilson como um sinônimo para células germinativas primordiais mitoticamente quiescentes (WILSON, 1896).

As células-tronco (CT), atualmente, são definidas como células que têm a capacidade de auto-renovação *in vivo* e *in vitro*, proliferação extensiva, se não indefinidamente, e de se diferenciar em um ou mais tipos celulares (THOMSON *et al.*, 1998; ODORICO *et al.*, 2001; PITTENGER *et al.*, 1999).

Avanços nesse campo dão suporte para a Medicina Regenerativa, que é uma área que se desenvolveu consideravelmente nos últimos anos. Essa emergente área da medicina utiliza procedimentos terapêuticos que incluem o transplante de células tronco, o uso de moléculas solúveis, a terapia gênica e a engenharia de tecidos. Atualmente, o método mais utilizado é o transplante de CT adultas. No entanto, ainda são mal compreendidos os mecanismos exatos pelos quais as células transplantadas podem promover a regeneração tecidual. Para explicar esses mecanismos têm sido sugeridas várias hipóteses, incluindo transdiferenciação celular, fusão celular e efeitos autócrinos e/ou parácrinos mediante a produção e liberação de moléculas solúveis com ações específicas, como por exemplo, fatores de crescimento e citocinas (FLORES *et al.*, 2006).

As CT podem ser classificadas segundo sua potencialidade (habilidade para diferenciação) em toti, pluri, multi e unipotentes, dependendo dos tipos de tecidos que são capazes de produzir (ZAGO, *et al.*, 2004; SCHWINDT *et al.*, 2005).

Também podem ser classificadas de acordo com sua origem em embrionárias (encontradas no blastocisto) e adultas (extraídas dos diversos tecidos, tais como medula óssea e sangue) (SCHWINDT *et al.*, 2005; DAHLGREN, 2009). As células-tronco embrionárias exibem ilimitada capacidade de renovação e pluripotência *in vitro*, pois podem se diferenciar em qualquer uma das três

camadas germinativas. A predisposição destas células em formar teratomas dificulta sua possível aplicação clínica (NOTH *et al.*, 2010).

As células-tronco adultas são células indiferenciadas encontradas em tecidos adultos, que mantém o potencial de diferenciação. A sua utilização é menos controversa, pois não envolve o uso de embriões e pelo seu potencial de diferenciação limitado (multipotentes), são menos prováveis em formar tumores (LEUNG *et al.*, 2006).

Durante vários anos, considerou-se que as células-tronco hematopoiéticas fossem as únicas células na medula óssea com capacidade regenerativa. Em 1960 foi identificado pela primeira vez que células derivadas da medula óssea eram capazes de se diferenciar em diferentes células de origem mesenquimal (FRIEDENSTEIN; PETROKOVA, 1966). A habilidade dessas CTM derivadas da medula óssea de se diferenciar em diferentes linhagens (osteoblastos, condrócitos e adipócitos) atualmente está amplamente comprovada (PITTENGER *et al.*, 1999; JIANG *et al.*, 2002). Atualmente há uma controvérsia entre os autores se as células adultas derivadas dos tecidos como medula óssea, gordura e sangue devem ser denominadas células-tronco ou células estromais (NAKIA *et al.*, 2010).

CTM derivadas da medula óssea madura são encontradas, após o nascimento, na fração não hematopoiética da medula óssea estromal, a qual abrange uma população heterogênea de células incluindo adipócitos, macrófagos, células reticulares, osteogênicas, musculares e endoteliais (HUI *et al.*, 2004).

A medula óssea adulta é considerada um dos principais reservatórios de CTM. Essas células são progenitoras multipotentes, não hematopoiéticas, facilmente isoladas e caracterizadas por sua extensa habilidade proliferativa e de se diferenciar *in vitro* em diversas linhagens mesenquimais em resposta a um estímulo apropriado, incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos, tenócitos e miócitos (ZAGO *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2008; DAHLGREN, 2009; NOTH *et al.*, 2010; WOO *et al.*, 1999; GAO e CAPLAN, 2003).

Adicionalmente, estudos têm demonstrado o potencial de diferenciação dessas células também em células do tecido nervoso (HERMANN *et al.*, 2004).

As CTM foram caracterizadas inicialmente *in vitro* pela sua aderência e morfologia fibroblastóide (CHEN *et al.*, 2008). Alguns marcadores de superfície celular têm sido utilizados para selecionar ou excluir CTM provenientes de populações celulares heterogêneas. Os marcadores de seleção de CTM em humanos incluem: HLA-ABC (MHC class I), CD90 (Thy-1), CD105 (Endoglin/SH2), CD106 (VCAM-1), CD73 (SH-3), CD166 (ALCAM), SSEA-4, Stro-1, SH-4 (FOX *et al.* 2007), CD29 (receptor de fibronectina), CD44, CD49a-f (Phinney e Prockop 2007), CD133 e Oct4 (TONDREAU *et al.* 2005). Já os de exclusão são: o HLA-DR (MHC class II), CD4 (co-receptor de célula T), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo), CD25 (receptor de interleucina-2), CD45 (antígeno de leucócitos) e CD34 (marcador hematopoiético) (FOX *et al.*, 2007).

Uso de CTM em cães

Diversas pesquisas em terapia celular e engenharia de tecidos estão sendo feitas ao redor do mundo em medicina veterinária de pequenos animais. A maioria dos estudos, atualmente tem como o objetivo definir protocolos seguros e eficazes para o uso de células-tronco na rotina clínica e cirúrgica, a fim de tratar doenças de prognóstico desfavorável e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

A busca por protocolos seguros e eficazes de terapia celular envolve pesquisas com objetivo de coletar, isolar e cultivar CTM de diferentes fontes teciduais, caracterizar imunofenotipicamente as CTM, definir a posologia mais adequada para o tratamento, definir a melhor via e o momento ideal para o transplante.

A seguir estão algumas doenças em que a terapia celular tem sido utilizada experimentalmente.

Sistema musculoesquelético

Os cães são acometidos frequentemente por problemas musculoesqueléticos, os quais limitam sua capacidade motora e qualidade de vida. Doenças degenerativas (Enfermidade articular degenerativa, osteoartrose, displasia coxofemoral), inflamatórias e traumáticas (fraturas, osteoartrite) são as mais comumente encontradas nesta espécie. A terapia celular poderia ser uma alternativa para ajudar repor o tecido ósseo atingido e como tratamento anti-inflamatório.

Um estudo realizado por ARINZEH *et al.* (2003), demonstrou radiográfica e histologicamente que as CTM alogênicas de medula óssea em cães incorporadas em implantes de hidroxiapatita-fosfato tricálcico melhoraram a reparação da lesão do fêmur 16 semanas após do tratamento, sem o uso de terapia imunossupressora.

Outro estudo similar utilizou seis cães como modelo animal para avaliar a cicatrização de defeitos segmentários em fêmur (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006). 16 dias após provocar um defeito de 21 mm no fêmur, CTM autólogas eram colocadas em cilindros de hidroxiapatita e implantadas na lesão, gerando um estímulo para neoformação óssea em áreas adjacentes ao implante, sugerindo que estas estavam se infiltrando no osso hospedeiro, ou estimulando o mesmo a formar novo osso.

CTM de medula óssea foram utilizadas para o tratamento de seis animais com não união de fratura de diferentes ossos por injeção percutânea. Três meses depois, apresentaram consolidação da fratura sem nenhuma reação inflamatória em tecidos adjacentes ou periosteais (ZAMPROGNO, 2007).

A aplicação intra-articular de 4,2 a 5 milhões de CTM autólogas de tecido adiposo na articulação coxo femoral em pacientes com osteoartrite crônica do quadril aliviou significativamente os sintomas de dor e claudicação e aumentou o ângulo de mobilidade dos membros pélvicos, incrementando a capacidade funcional dos animais tratados (BLACK *et al.*, 2007).

Pesquisa feita para avaliar biomateriais e CTM de medula óssea para o reparo de tecido ósseo e muscular demonstrou que novos substitutos bifásicos ósseos sintéticos podem oferecer melhores condições para regeneração óssea em combinação com CTM (JAFARIAN *et al.*, 2008).

Outro estudo demonstrou a possibilidade de transplantar CTM mesoangioblásticas (vasos sanguíneos) intra-arterial em Golden Retriever com distrofia muscular. O resultado obtido foi uma reconstituição extensa das fibras que expressam distrofina, a melhoria da força de contração e função muscular e uma preservação na capacidade de andar (SAMPAOLESI *et al.*, 2006).

Sistema nervoso

As neuropatias centrais e periféricas em pequenos animais são relativamente comuns e quase sempre deixam sequelas que prejudicam a qualidade de vida do animal. As doenças neurológicas que mais comumente acometem os cães são as de origem inflamatória (meningoencefalomielites granulomatosa, meningoencefalomielite necrotizante, leucoencefalomielite necrotizante) traumáticas e vasculares (trauma medular agudo, acidente vascular cerebral, tromboembolismo fibrocartilagenoso), infecciosa (encefalites virais, bacterianas, protozoárias e fúngicas), neoplásica (neoplasias primárias e secundárias) e degenerativa (Síndrome da disfunção cognitiva, discopatia tipo II), entre outras. O tratamento com CTM pode ser de grande valia para a recuperação desses pacientes, devido as suas qualidades neuroproliferativas, paracrina e anti-inflamatórias, descritas anteriormente.

Lim *et al.* (2007) transplantaram, no local da lesão, 1×10^6 CTM de cordão umbilical alogênicas, em cães com trauma medular. Duas semanas depois, a função dos membros pélvicos e a velocidade de condução nervosa melhoraram significativamente comparadas com o grupo controle.

Outro estudo similar avaliou o transplante intralésional de 1×10^6 CTM alogênicas derivadas de tecido adiposo, uma semana após a lesão medular. Observou-se notável recuperação da função neurológica dos membros pélvicos

nove semanas pós-tratamento. A velocidade de condução nervosa com base no potencial evocado somatosensorial, foi significativamente favorável nos animais transplantados. Além disso, GFAP, Tuj-1 e NF160 foram observados por imunohistoquímica em células derivadas de CTM de tecido adiposo transplantadas. Estes resultados sugerem que a melhoria na função neurológica pelo transplante de CTM proveniente de tecido adiposo em cães com lesão na medula espinhal pode ser parcialmente devido à diferenciação neuronal das células-tronco aplicadas (RYU *et al.*, 2009).

Lee *et al.*, (2010) avaliaram o potencial de remielinização das CTM de cordão umbilical humano em medulas espinhais lesionadas de cães. A recuperação funcional dos membros pélvicos foi satisfatória em quatro dos cinco pacientes tratados. Os resultados histológicos mostraram que muitos axônios foram remielinizados satisfatoriamente.

Chung *et al.* (2009), examinaram os efeitos de CTM do sangue de cordão umbilical humano injetadas através da artéria basilar em um modelo de isquemia cerebral tromboembólico canino. A isquemia cerebral foi induzida através de uma oclusão da artéria cerebral média por tromboembolismo pela injeção de coágulos elaborados com 0,2 ml do sangue arterial do paciente e 10 Us (1,000 U/ml) de trombina bovina, em 10 cães da raça Beagle. No grupo tratado, foram transplantadas 1×10^6 CTM através da artéria basilar um dia após da indução da anóxia através de uma abordagem endovascular. Ao exame neurológico e de ressonância magnética, observou-se recuperação clínica e diminuição na área infartada uma semana após a indução da injúria, comparado com o grupo controle. As células transplantadas se diferenciaram parcialmente em neurônios e astrócitos e expressaram fatores neuroprotetores (fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)) quatro semanas pós-tratamento.

O transplante perineural de 1×10^6 CTM autólogas de medula óssea num cão com neurite do nervo ciático determinou a melhora dos sinais neurológicos, tais como déficit proprioceptivo e paresia, um mês depois do tratamento (HECKLER *et*

al., 2012). Alguns estudos comprovaram o potencial de regeneração das CTM, através de mecanismos neuroprotetores, incluindo a melhora do microambiente potencializando os mecanismos de regeneração, síntese de fatores de crescimento ou citocinas, efeitos vasculares e remielinização (PARR *et al.*, 2007).

O tratamento com CTM pode ser eficaz na desaceleração da degeneração do disco intervertebral em pequenos animais, segundo Hiyama *et al.* (2008), já que a terapia celular teria um efeito sobre a supressão da degeneração e preservação do privilégio imunitário deste.

Sistema cardiovascular

Em um modelo canino com isquemia crônica induzida do miocárdio, foram tratados com 100×10^6 CTM-MO alogênicas intramiocárdicas 12 pacientes, os quais evidenciaram uma maior fração de ejeção, diminuição da fibrose e maior densidade vascular 60 dias pós-transplante. As CTM se diferenciaram em células de músculo liso e células endoteliais, analisadas por imunohistoquímica, o que resulta num aumento da vascularização e uma melhor função cardíaca (SILVA *et al.*, 2005).

Sistema tegumentário

Feridas cutâneas de seis milímetros de diâmetro elaboradas cirurgicamente foram tratadas por Kim *et al.* (2013) com CTM de medula óssea via intradérmica, em diferentes concentrações, 24 horas após a injúria. Exames seriados histológicos e imunohistoquímicos do tecido comprometido foram realizados, o que demonstrou uma re-epitelização mais rápida e maior deposição de colágeno e angiogênese. Além disso, aplicadas topicamente demonstraram um efeito supressor sobre a inflamação local na pele ferida, sugerindo que podem ser aplicadas em pacientes com doenças dermatológicas inflamatórias e fibróticas.

CAPÍTULO 2

JAVMA

Instructions for Authors - Editorial Policies

The Journal of the American Veterinary Medical Association is a peer-reviewed general veterinary medical journal that publishes manuscripts dealing with any subject germane to the practice of veterinary medicine. For scientific manuscripts, preference will be accorded to those that have clinical or practical value.

Authors who submit manuscripts to the journal should carefully read these Instructions for Authors when preparing their manuscripts, because compliance with these instructions will help reduce delays in manuscript processing. Authors submitting manuscripts for publication in specific features of the journal should also read recent issues of the journal for examples of how such reports and features are typically organized. Authors who have additional questions are encouraged to consult with an AVMA scientific editor prior to manuscript submission.

Authorship—Individuals should be listed as authors only if they 1) made a substantial contribution to the conception and design of the study, the acquisition of the data used in the study, or the analysis and interpretation of that data; 2) were involved in drafting or revising the manuscript critically for important intellectual content; and 3) will have an opportunity to approve subsequent revisions of the manuscript, including the version to be published. All 3 conditions must be met. Each individual listed as an author must have participated sufficiently to take public responsibility for the work. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research team does not, alone, justify authorship.

For multi-institutional studies, the individual who headed the study should be listed as an author, along with individuals who provided assistance with pathological evaluations (eg, review of gross and histologic specimens) and statistical analyses and any other individual who had a substantial impact on the study design or made a unique contribution to the study. Individuals who submitted case material should be listed as authors only if they contributed at least 10% of the cases included in the study; individuals who contributed less than 10% of the

cases should be listed in the acknowledgments. Requests to list a working group or study group in the byline will be handled on a case-by-case basis.

Prior publication—A manuscript is received with the understanding that it and all revisions have been approved by all authors and that neither the manuscript nor any of its parts has been published, except as an abstract (authors are encouraged to consult the guidelines for preparation of scientific abstracts when preparing scientific abstracts for publications), or is under concurrent consideration by any other publication. The corresponding author must provide a signed statement to this effect.

A manuscript containing information published in any compiled printed (eg, journals, symposia, proceedings, newsletters, books) or electronic (eg, websites, CD-ROMs, DVDs, or blogs) format may be rejected on the grounds of prior publication. Publication of abstracts less than 250 words long does not constitute prior publication; however, publication of longer abstracts may.

At the time of manuscript submission, the corresponding author must include copies of any abstracts of the manuscript that have been published or submitted for publication or that are expected to be submitted for publication.

Copyright—The Journal of the American Veterinary Medical Association is covered by copyright. All authors will be required to sign a written statement transferring copyright to the AVMA prior to publication of any manuscript or letter. Requests to copy, reprint, or use portions of published material (including information in figures and tables) should be addressed to the editor-in-chief.

Authors must obtain permission from the copyright holder (most often, the author or publisher) if they wish to include items such as figures or appendices that appeared or will have appeared in other published reports, regardless of the originating source.

Original artwork that was created specifically for use in the manuscript must be accompanied by a letter explaining the conditions under which the work was

created. The letter must be signed by the artist and should specify the rights given to the authors for use of the artwork and the rights retained by the artist (if any). If rights are retained by the artist, the letter must include a statement that allows the journal to use the material for publication in print and online.

Commercial availability of products used—A manuscript reporting results of a study that involved evaluation of the efficacy or safety of a pharmaceutical, biologic, or other product or in which such products were relevant to the diagnosis, treatment, or outcome will be considered only if the product is commercially available in the United States and can legally be used in the species of interest.

Humane animal care and use—For consideration for publication in the JAVMA, all research studies involving animals must have been performed in compliance with guidelines outlined in the (USDA website), US Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals (NIH website), NRC Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academies Press website), or Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching (Federation of Animal Science Societies website) or with equivalent guidelines. Methods of euthanasia must comply with the AVMA Guidelines on Euthanasia (PDF).

A manuscript containing information that suggests that animals were subjected to adverse, stressful, or harsh conditions or treatments will not be considered for publication unless the authors demonstrate convincingly that the knowledge gained was of sufficient value to justify these conditions or treatments.

Letters to the editor—Readers who submit letters to the editor must limit them to 500 words (longer letters will be condensed as needed) and 6 references. Letters must be original and cannot have been published or submitted for publication elsewhere. Not all letters are published; all letters accepted for publication are subject to editing. Those pertaining to anything published in the AJVR should be received within 1 month after the date of publication of the

material to which they may refer. Submission via e-mail (JournalLetters@avma.org) or fax (847-925-9329) is encouraged; authors should give their full contact information including address, daytime telephone number, fax number, and e-mail address. Letters containing defamatory, libelous, or malicious statements will not be published, nor will letters representing attacks on or attempts to demean veterinary societies or their committees or agencies.

Dual-use research of concern—Although openness in science is recognized as the goal in publishing decisions, with advances in molecular and cell biology, genetics, microbiology, and other life sciences, it has become increasingly possible to manipulate aspects of biological systems to better understand healthy states as well as mechanisms of disease in animals and humans. In doing so, there is the potential that information, products, or technologies that result from life sciences research may be misused for harmful purposes. The US National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB) has proposed a definition for dual-use research of concern and a framework for overseeing this research.

Dual-use research of concern is research that, based on current understanding, can be reasonably anticipated to provide knowledge, products, or technologies that could be directly misapplied by others to pose a threat to public health, safety, agricultural crops and other plants, animals, the environment, or material.

As such, the Journal of the American Veterinary Medical Association has adopted the following policy regarding assessment of submitted manuscripts with potential dual-use content:

- Any manuscript submitted for publication that raises concerns regarding dual-use potential will be subject to editorial review to determine the risks and benefits to the scientific community and to the public at large that may result from publication. The AVMA scientific editors maintain a strong commitment against

withholding scientific or other information unless there are compelling reasons to do so.

- The scientific editors reserve the right to seek special external review of these manuscripts from individuals with technical and biosecurity expertise to assist their decision.

- Authors and reviewers are expected to alert the AVMA scientific editors when submitting or reviewing manuscripts with dual-use potential.

- The final decision for publication, as well as the means of communicating manuscripts with dual-use potential, will be made by the editor-in-chief. An accompanying editorial may be published.

Manuscript categories

Authors may submit manuscripts for publication in the Views, Veterinary Medicine Today, and Scientific Reports sections of the journal.

Views—The Views section is a forum for exchange of ideas and includes:

- Letters to the Editor
- Commentaries

Veterinary Medicine Today—The Veterinary Medicine Today section promotes continuing education through didactic exercises, case discussions, and updates on clinical topics. Not every feature is published in every issue. Authors who wish to contribute a manuscript to the following features should consult the instructions for those features.

Scientific Reports—The Scientific Reports section contains reports of important original research and critical reviews and includes:

- Original Studies

- Clinical Reports
- Reference Point (review) articles

Manuscripts based on original research that involved animals with a naturally developing or experimentally induced disease or condition will be considered for publication as Original Studies. This includes manuscripts based on evaluations of case records accumulated during a specific period (ie, case series). Manuscripts that describe features of 1 or more clinical cases will be considered for publication as Clinical Reports. Reference Point articles are concise, critical reviews concerning subject areas in which important advances have been made during the past 5 years and contain information that has, or will have, clinical applications.

Manuscript Preparation

Format—Manuscripts (including footnotes, references, figure legends, and tables) should be prepared with the following attributes:

- 8.5 X 11-inch (or A4) page size
- Double-space typed
- 12-point Times New Roman font
- 1-inch (2.5-cm) margins
- Left justification
- Sequential line numbering

Organization and contents—Manuscripts should be organized as follows:

- Title page

- Structured abstract (when applicable; letters to the editor, commentaries, feature submissions, and Reference Point articles excluded)

- Text
- Footnotes
- References
- Figure legends
- Tables

Title page—The title page (see example) must include the title and the first name, middle initial, and last name of each author, along with each author's professional degree, highest earned academic degree, and diplomate status (for authors who are diplomates of AVMA-recognized specialty organizations). Professional affiliations (full mailing addresses) of the authors at the time of the study should be indicated. If an author's affiliation has changed since the study was performed, the author's new affiliation should be identified as well (eg, "Dr. Researcher's present address is..."). If information in the text has been presented at a scientific meeting, this should be indicated on the title page, including the nature of that presentation (eg, abstract or poster). Sources of funding, financial conflicts of interest, disclaimers, acknowledgments, and the name and e-mail address of the corresponding author should also be included on the title page.

Acknowledgments—The acknowledgments should be used to identify specific individuals who had an important role in or made important contributions to the study but who do not meet the criteria for authorship. In general, this includes individuals who contributed intellectually to the study or report but whose contributions do not justify authorship, individuals who provided technical assistance (eg, individuals who performed special tests or research), and individuals who provided assistance with the statistical analyses.

The acknowledgments should not be used simply as a method of expressing gratitude to individuals who had a minor role in the study. The acknowledgments should not include individuals whose only contribution to the study or report involved the routine performance of their normal job duties and who did not offer any unusual intellectual contribution or technical expertise. Acknowledgments of nonspecific groups (eg, the intensive care unit technicians) and unidentifiable groups (eg, the anonymous contributors or study participants) are not allowed.

Authors are expected to acknowledge all sources of funding and to disclose any financial interests (including ownership, employment, consultancy arrangements, and service as an officer or board member) they have with companies that manufacture products that are the subject of their research or with companies that manufacture competing products.

Structured abstract—With the exception of review articles, all manuscripts submitted for consideration as a Scientific Report must include a structured abstract of 250 or fewer words.

For an Original Study, the structured abstract must include the following headings:

- Objective
- Design (type of study)
- Animals (or Sample)
- Procedures
- Results
- Conclusions and Clinical Relevance

Text - Original Study—The text for an Original Study begins with an introductory section and then is organized under the following headings:

- Materials and Methods

- Results
- Discussion

The introductory section should supply sufficient pertinent background information to allow readers to understand and interpret results. It must include the rationale for the study, the investigators' hypothesis, and a clear statement of the purpose of the study.

The Materials and Methods section should describe the experimental design in sufficient detail to allow others to reproduce the study. A subsection detailing statistical methods used to summarize data and test hypotheses and the level of significance used for hypothesis testing should be provided. Products, equipment, and drugs should be identified in the text by chemical or generic names or descriptions. A trade name may be included in a lettered footnote if that specific product, equipment, or drug was essential for the outcome. For all statistical tests, authors are required to indicate whether applicable test assumptions were met. When citing software products, use a footnote to cite the software or software program used (eg, PROC GLM, SAS Institute, Cary, NC) and a reference to cite a User's Guide (eg, SAS/STAT9.2 user's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2008;page number).

With the exception of reports of retrospective studies, manuscripts describing studies that involved the use of animals, including studies that involved the use of privately owned animals (eg, animals owned by clients, staff members, students, or private entities), must include a statement that the study protocol was reviewed and approved by an appropriate oversight entity (eg, an animal care and use committee or institutional review board) or was performed in compliance with institutional or other (eg, governmental or international) guidelines for research on animals. If animals were euthanatized, the method of euthanasia must be indicated. Manuscripts describing prospective studies that involved privately owned animals must also include a statement indicating that owner consent was obtained.

The Results section should provide data that are clearly and simply stated without discussion or conclusions. Tables and figures should be cited parenthetically. Authors should refrain from repeating within the text data that are also presented in tables. Authors of manuscripts reporting gene sequences should submit those sequences to an appropriate data bank.

The Discussion section should focus on findings in the manuscript and should be brief, containing only discussion that is necessary for interpretation of findings. The Discussion should concentrate mainly on what is known in nonhuman animals, with less emphasis on what is known in humans.

To ensure thoroughness of reporting, authors of Scientific Reports are strongly encouraged to make use of the following guidelines when preparing manuscripts:

- CONSORT (CONsolidated Standards of Reporting Trials) – for clinical trials
- REFLECT (Reporting guidELines For randomized controLled trials for livEstocK and food safeTy) – for clinical trials in livestock and food safety
- STARD (STAndards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies) – for diagnostic test evaluation
- STROBE (Strengthening The Reporting of OBservational studies in Epidemiology) – for cross-sectional, case-control, and cohort studies
- PRISMA (Preferred Reporting Items of Systematic Reviews and Meta-Analyses) – for meta-analyses and systematic reviews
- ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) – for all studies involving laboratory animals

Case Series Reports (retrospective or prospective) must include a meaningful statement of purpose, clinically relevant data, and clinically useful conclusions or

interpretations derived directly from evaluation of the cases described. Except for rare conditions, case series reports should contain information on at least 10 animals. Formatting of case series reports differs slightly from that of other original studies. Specifically, the title must include the number of cases and the interval during which cases were treated. The general format is as follows: Behavioral modification for treatment of separation anxiety in dogs: 223 cases (2005-2010). In addition, the Materials and Methods section should begin with the subheadings "Case selection" and "Medical records review."

Text - Clinical Report—A Clinical Report begins with the signalment (eg, age, sex, body weight, and breed) of the animal or animals, followed by a chronologic description of pertinent aspects of the diagnostic examination, treatment, and outcome, and ends with a brief discussion. When more than 1 animal is involved, a representative of the group should be described in detail; important differences among animals can be addressed separately. For reports in which there are 3 or fewer animals, pertinent abnormal findings should be summarized in the text. For 4 or more animals, 1 table that provides a summary of pertinent abnormal findings may be accommodated, provided that such findings are not repeated in the text.

Manuscript Style

For questions of style, refer to the latest edition of the American Medical Association Manual of Style (online access requires a subscription; individual subscriptions are available on a monthly basis if desired). Manuscripts should be written in American English. For spelling of lay terms, refer to the latest American edition of the Merriam-Webster Dictionary. For anatomic terms, use anglicized versions of official terms listed in the *Nomina Anatomica Veterinaria*. Refer to the latest editions of the American Drug Index and USP Dictionary of USAN and International Drug Names for proper spelling of chemical and drug names and to the latest edition of Dorland's Illustrated Medical Dictionary for proper spelling and use of medical terms. Refer to Bergey's Manual of Determinative Microbiology for spelling and correct taxonomic classifications of microorganisms.

Abbreviations—In general, use of abbreviations other than standard abbreviations and units of measures should be kept to a minimum. In the structured abstract, a term should be abbreviated only if it is used at least 3 times in the structured abstract. The term must be expanded at first mention, with the abbreviation given in parentheses after the expanded term. Similarly, in the text, figures, and tables, a term should be abbreviated only if it is used at least 3 times. All abbreviations except for standard abbreviations and units of measure should be listed in alphabetical order at the beginning of the manuscript text, along with their definitions. These abbreviations should then be used without expansion in the text, except when used to start a sentence.

Abbreviations that appear only in the figures or tables should be defined in the table or figure legend. Except for the abbreviations ELISA, ACTH, EDTA, DNA, and RNA, abbreviations should not be used in titles.

Products, equipment, drugs, and other materials—Materials used in the study or referred to in the manuscript should be identified by chemical or generic names or descriptions. A trade name may be included in a lettered footnote (see "Footnotes" below for more information) if that specific product, equipment, or drug was essential for the outcome. Trademark and similar proprietary symbols are not needed.

Metric conversions —Body weights and temperatures must be reported in metric, with traditional US (lb, °F) units reported afterward in parentheses. Doses and dosages must be given on a mg/kg and mg/lb basis. All dosages must include route of administration and interval (eg, 10 mg/kg [4.5 mg/lb], IV, q 12 h). For conversion assistance, you may wish to consult an online measurement converter such as <http://www.megaconverter.com/mega2/>.

Footnotes—Footnotes are to be used when referencing each of the following types of information:

- Abstracts

- Conference presentations
- Online databases
- Personal communications
- Products, drugs, equipment, and other materials (see related section above for more information)
- Statistical and computer software
- Theses and dissertations

For specific products, equipment, or drugs, please limit footnotes to those that were essential to the outcome of your report or study. Products and equipment that are commonly used materials in veterinary medicine need not be footnoted.

If more than 26 footnotes are required, continue the sequence with double letters (eg, aa, bb, and cc). List footnotes alphabetically just before the references. For products and equipment, provide complete information in the footnote, including manufacturer's name and location (ie, city, state, and country [if other than the United States]).

References—Authors bear primary responsibility for accuracy of all references. References must be limited to those that are necessary and must be cited in the text by superscript numbers in order of citation. Journal titles in the Reference section should be abbreviated in accordance with the National Library of Medicine(NLM website) and Index Medicus (non-AVMA website). For references with more than 3 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by "et al." The following is the style used for common types of references:

Article in journal

1. Lamont LA, Bulmer BJ, Sisson DD, et al. Doppler echocardiographic effects of medetomidine on dynamic left ventricular outflow tract obstruction in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002;221:1276–1281.

Book chapter

2. Muir P, Johnson KA, Manley PA. Fractures of the pelvis. In: Birchard SJ, Sherding RG, eds. *Saunders manual of small animal practice*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 2000;1126–1132.

Proceedings

3. Moore MP, Bagley RS, Harrington ML, et al. Intracranial tumors, in *Proceedings*. 14th Annu Meet Vet Med Forum 1996;331–334.

Electronic material

4. Animal and Plant Health Inspection Service website. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). Available at: www.aphis.usda.gov/lpa/issues/bse/bse.html. Accessed Feb 18, 2003.

Figures—Limit figures to those that reduce or clarify the text. Images of clinically normal animals are not usually required, nor are images of equipment unless the equipment has been set up in a special way and the setup is integral to the study. Text and symbols should be large enough that they will still be legible when the figure is reduced to 1 column in width during publication (in general, this means that all text and symbols must be at least 1.5 mm tall when the figure is reduced to 8 cm in width). Text labels should start with a capital letter (eg, Anterior vena cava).

To ensure high-quality reproduction, symbols used to represent data in graphs should be limited to open and closed circles, triangles, and squares; axes should be labeled in Helvetica or Arial font. Keys to data symbols may be placed in a small box inserted into the unused portion of graphs.

Photomicrographs and electron micrographs must include an internal scale marker. For figures that include multiple panels, each panel should be sequentially labeled with a capital letter in the same corner of each panel. If a figure contains 2 or more rows of panels, the letter labels should be applied sequentially from left to right in the first row, then from left to right in the second row and so on.

For preparation of digitized versions of figures, please see the section on preparation of electronic files for manuscript submission.

Figure legends must be provided at the end of the manuscript, before any tables. Sufficient information should be included to allow the figure to be understood without reference to the text. Abbreviations defined in the text do not need to be expanded; however, newly introduced abbreviations in figures should be defined in the figure legend, in alphabetical order. When applicable, stains used for histologic sections should be indicated in the legend as well as the scale of the marker bar (eg, H&E stain; bar = 100 μ m). Figure legends for ECG traces must include the paper speed and scale (eg, Paper speed = 50 mm/s; 1 mV = 10 mm). Authors wishing to use any previously published figures must submit written permission from the copyright holder.

Tables—Submission of excessive tabular data is discouraged, and tables should be limited to those containing data important to understanding and interpreting results of the study. All tables should be included at the end of the manuscript, after the figure legends. Authors will be asked to delete tables containing data that could be reported more succinctly in the text. Tables that focus solely on findings in individual animals rather than summary data from groups of animals are to be avoided. Authors wishing to use any previously published tables must submit written permission from the copyright holder.

For order of symbol use in tables, please refer to the figure instructions above. To indicate significant differences between or among values in a row or column, symbols or superscript lowercase letters assigned in alphabetical order (a–z) may be used. If additional differentiation is needed (eg, if differences need to be

reported in both rows and columns) and lowercase letters have already been used, superscript uppercase letters in alphabetical order (A–Z) may be used.

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/avma>. They may also be submitted by conventional postal mail, but online submission is recommended to expedite processing.

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista JAVMA (Journal of the American Veterinary Medical Association).

VIABILIDADE E SEGURANÇA DO TRANSPLANTE INTRATECAL DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS AUTÓLOGAS E ALOGÊNICAS PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES (LUPUS CANIS FAMILIARIS)

RESUMO

Objetivo: avaliar clínica e laboratorialmente a viabilidade e a segurança do transplante intratecal de células-tronco mesenquimais autólogas e alogênicas provenientes da medula óssea (CTM-MO) de cães.

Animais: Foram utilizados 15 cães, sem raça definida, adultos, de ambos os sexos, clinicamente saudáveis, excetuando dois que apresentavam trauma medular crônico.

Procedimento: os cães foram divididos em três grupos, contendo cinco animais cada. As CTM-MO foram obtidas pela punção da medula óssea, isoladas e cultivadas. O grupo A foi transplantado com CTM-MO autólogas por via intratecal através da cisterna magna, enquanto que o grupo B recebeu as CTM-MO alogênicas e o grupo C (controle) foi aplicado solução tampão fosfato-salina (PBS). O líquido cefalorraquidiano (LCR) foi obtido imediatamente antes do transplante das CTM-MO (momento 1) e no quinto dia após (momento 2), para avaliação físico-química, citológica e da concentração de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9). Todos os animais foram acompanhados por exame físico neurológico pré e pós-transplante.

Resultados: Pelas avaliações clínicas e laboratoriais, não se observaram alterações significativas após o transplante das CTM-MO autólogas e alogênicas

por via intratecal, demonstrando ser uma via segura e viável para a utilização de terapia celular em cães.

Conclusões e relevância clínica: A terapia celular pode ser transplantada via intratecal tanto de CTM-MO autólogas como alogênicas em cães para poder ser implementada na rotina médica veterinária em pequenos animais por ser minimamente invasiva e permitir um aporte adequado destas no tecido nervoso.

Abreviações:

CT: células-tronco.

CTM: células-tronco mesenquimais.

CTM-MO: células-tronco mesenquimais de medula óssea.

LCR: líquido cefalorraquidiano.

MMP: metaloproteinase.

INTRODUÇÃO

As Células-tronco (CT) podem ser definidas como células com grande capacidade de proliferação e auto-renovação, além da capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes linhagens celulares mais especializadas (1,2). A medula óssea adulta é considerada um reservatório de células-tronco mesenquimais (CTM), as quais possuem efeito parácrino com propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras (3) e que, de acordo com alguns autores, podem sofrer transdiferenciação (capacidade de se diferenciar em células da linhagem ectodermal e endodermal sob estímulos adequados) em células nervosas, incluindo neurônios e células da glia (4, 5, 6).

As pesquisas sobre a biologia das CT estão evoluindo cada vez mais na medicina humana e veterinária, começando a ser uma alternativa promissora para o tratamento de diversas enfermidades, dentre elas as neurológicas. Em pequenos animais, os avanços no tratamento com CTM oferecem outra opção na

terapêutica de diferentes tipos de doenças, como enfermidade articular degenerativa (7), não união óssea (8), lesões medulares (9), entre outras.

A via utilizada para o transplante das células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) em cães pode interferir diretamente no sucesso do tratamento. A via intratecal pode ser vantajosa, uma vez que é menos invasiva que a aplicação intra/perilesional no tecido nervoso e permite a passagem pela barreira hematoencefálica, possibilitando que um maior número de células atinja ao local de lesão (10).

Diante da prevalência de enfermidades neurológicas em cães, o transplante de CTM-MO intratecal pode se tornar uma estratégia terapêutica importante para minimizar e regenerar o tecido nervoso lesado.

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar clínica e laboratorialmente a viabilidade e a segurança do transplante intratecal de CTM-MO autólogas e alogênicas de cães, visando sua aplicação futura na terapia celular de enfermidades neurológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram submetidos à análise da Comissão de Ética da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP-Botucatu.

Foram utilizados 15 cães no estudo. 13 animais foram selecionados do canil do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP/ Botucatu, sem raça definida, adultos, de ambos os sexos, com peso médio de 13 kg [28.66 lb]. A seleção dos animais foi feita mediante exame clínico, utilizando-se como critérios de inclusão ausência de histórico de doença neurológica prévia e exame físico geral e neurológico normal segundo Platt e Olby (11). Dois pacientes com trauma medular crônico do Hospital Veterinário da UNESP, Botucatu, foram incluídos no estudo, os quais

apresentavam lesão medular entre as vértebras T13 e L1, paraplegia dos membros pélvicos sem ausência de dor profundo e incontinência urinária.

Os cães hípidos selecionados foram divididos aleatoriamente em três grupos contendo cinco animais cada. Os cães do grupo A (n=5) receberam o transplante das CTM-MO autólogas por via intratecal, enquanto que os do grupo B (n=5) foram aplicadas as CTM-MO alogênicas pela mesma via, assim como os do grupo C (controle) (n=5), que receberam solução tampão fosfato-salina (PBS). Os animais com mielopatia foram incluídos no grupo alogênico. O líquido cefalorraquidiano (LCR) foi obtido mediante punção da cisterna magna imediatamente antes da aplicação das CTM-MO (momento 1) e no quinto dia após (momento 2), para avaliação físico-química, citológica e determinação da concentração de metaloproteinase 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) latente e ativa. Todos os grupos foram acompanhados por exame físico neurológico no momento 1 e 2.

Punção aspirativa da medula óssea: a punção aspirativa da medula óssea foi realizada conforme a metodologia descrita por Zamprognio (8) com modificações. Para isso, os animais receberam medicação pré-anestésica com Morfina 0.5mg/kg [1.1mg/lb], Acepromacina 0.05mg/kg [0.11mg/lb], Meloxicam 0.2 mg/kg [0.44mg/lb] e em seguida anestesiados com propofol 5 mg/kg [11mg/lb]. Em seguida, foi realizada a tricotomia e antissepsia da cabeça do úmero. Posteriormente foi introduzida a agulha de punção de medula óssea, modelo Jamshidi. Uma vez fixa a agulha dentro do úmero, o mandril foi retirado e se procedeu à aspiração das células da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20ml contendo 1ml de heparina a 1000 UI/ml, coletando entre 10 a 15 ml por animal. Essas amostras foram identificadas, e encaminhadas ao Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP Botucatu, o qual se encontra equipado adequadamente para a realização do isolamento e cultivo celular.

Isolamento e cultivo das CTM-MO: as CTM-MO foram isoladas e cultivadas por aproximadamente 20 dias, para posterior transplante. Essas células foram

caracterizadas pela aderência ao plástico em cultura celular; fenotipicamente por apresentarem positividade CD44^a e CD 105^b e negatividade para CD34^c ; pela diferenciação em tecido adiposo, cartilagem e osso, mediante estímulos específicos *in vitro*.

As amostras de sangue da medula óssea foram filtradas utilizando-se um filtro de equipo de transfusão a fim de remover os coágulos. Em seguida foi realizada à primeira centrifugação do material a 1500 RPM por 10 minutos, sendo o sobrenadante (plasma e gordura) descartado e o material remanescente reservado. Ao material remanescente foi adicionado o meio DMEN alta glicose/F12^d na proporção de 1:1. Posteriormente, a essa mistura foi acrescentado lentamente 5 ml de Ficoll- paquetm premium 1073^e e, em seguida se procedeu a uma nova centrifugação a 1500 RPM por 40 minutos para a obtenção da camada de células mononucleares, onde estão presentes as células mesenquimais. A camada de células mononucleares resultante da centrifugação foi aspirada cautelosamente e acondicionada em um novo tubo, no qual foi acrescentado o meio DMEN alta glicose/F12 na proporção de 1:1. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 1500 RPM por 10 minutos para a remoção do Ficoll- paquetm premium 1073 remanescente. O pellet de células resultantes foi ressuscitado com o meio DMEN alta glicose/F12 na proporção de 1:1 e submetido a uma nova centrifugação a 1500 RPM por 10 minutos. Após essa centrifugação o sobrenadante foi descartado e ao novo pellet formado foi adicionado 1 ml do meio contendo 80% de DMEN alta glicose/F12, 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (10 µl/ml) e anfotericina B (3µg/ml). O volume dessa suspensão foi dividido em duas garrafas, acrescentadas cada uma de 5 ml de meio. As placas foram identificadas e incubadas em estufa a 37°C [98.6 °F] em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. Nas 48 primeiras horas não se manipularam as placas para poder obter a adesão celular. Entretanto, após esse período as garrafas foram monitoradas periodicamente e o meio de cultura foi trocado a cada quatro ou cinco dias. O repique das células foi realizado quando se atingiu uma confluência de aproximadamente 80%. Para isso, foi realizada a tripsinização que consiste da adição de tripsina, para que haja o rompimento das

junções entre as células e estas se soltem do fundo da garrafa. O meio de cultivo das garrafas foi descartado, e adicionado uma solução de tripsina a 0,25% a 37°C [98 °F]. As garrafas foram levadas para a estufa de cultivo por 5 minutos para que as células se soltem do fundo da garrafa. Com as células em suspensão, foi adicionado em proporção 1:1 meio de cultura contendo 80% de DMEN alta glicose/F12, 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (10 µl/ml) e anfotericina B (3µg/ml). Em seguida, se procedeu à centrifugação a 1500 RPM por 10 minutos para a remoção da tripsina que é tóxica as células. O novo pellet formado foi ressuspendido em PBS para ser transplantado.

Preparação das CTM-MO: o transplante das CTM-MO foi realizado após a segunda passagem do cultivo celular, quando as células atingirem confluência de aproximadamente 80%. Nesse momento foi efetuada a tripsinização, pela adição de solução de tripsina a 0,25% a 37°C [98.6°F]. As garrafas de cultivo foram introduzidas na estufa (37°C [98.6°F] e 5% CO₂) por 5 minutos para que as células se soltem do fundo da garrafa. Com as células em suspensão, foi adicionado na proporção de 1:1 meio de cultura contendo 80 % de DMEN baixa glicose/F12, 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (10 µl/ml) e anfotericina B (3µg/ml). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1500 RPM por 10 minutos para a remoção da tripsina que é tóxica as células. Posteriormente, o pellet resultante foi ressuspendido em PBS. Uma alíquota dessa suspensão foi corada com azul de tripan para a contagem e avaliação da viabilidade celular, com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Transplante intratecal das CTM-MO

Em uma seringa foram resuspendidas as células em 1ml de PBS contendo em média $1,52 \times 10^6$ CTM-MO e transplantado imediatamente por via intratecal. Para o transplante das CTM-MO dos grupos autólogo, alogênico e para inoculação da solução de PBS, os respectivos cães foram submetidos ao protocolo anestésico com Acepromazina 0.05mg/kg [0.11mg/lb], Morfina 0.5mg/kg [1.1mg/lb] seguida de indução com propofol 5 mg/kg [11mg/lb] e manutenção com isoflurano. Após tricotomia e antissepsia da região atlanto-occipital foi introduzida a agulha espinhal

de 25 Gx3^{1/2}" (0,50x90 mm) até a cisterna magna para obtenção de amostras do LCR, conforme descrito por De Lahunta e Glass (12).

Avaliação clínica neurológica: durante a fase experimental, foi realizado exame físico geral e neurológico segundo Platt e Olby (11) no momento 1 e 2 em cada animal. Para a análise do exame neurológico foram avaliadas as variáveis: estado mental, nervos craniais, reações posturais, função urinária, avaliação sensorial e palpação/manipulação. Foram numerados os critérios de cada variável como: 1= normal, 2= anormal. A pontuação Olby foi também utilizada para todos os animais, sendo 14 o valor de normalidade (13). Cada parâmetro foi organizado por cada grupo nos momentos 1 e 2, calculadas as medianas e tabulados para sua análise.

Análise do LCR: a análise do líquido cefalorraquidiano foi realizada, conforme descrito por Wamsley e Alleman (14) de acordo com os seguintes parâmetros: aspecto, cor, densidade, pH, coagulação, proteína total, globulinas (teste de Pandy), glicose, contagem global e contagem diferencial de células. Uma vez obtidos todos os dados do exame físico, químico e citológico do LCR, foram tabulados para sua análise.

Determinação da concentração de metaloproteinases: as amostras de LCR foram acondicionadas em criotubos, congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido à -196°C [-384.8°F] até o processamento. Foi determinada a concentração de metaloproteinase (MMP-2 e MMP-9) latente e ativa no LCR pela técnica de zimografia segundo MACHADO, *et al*, (15), como um marcador de processo inflamatório. Foram calculadas as medianas e tabuladas para sua análise.

Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM-MO: após a segunda passagem, uma amostra foi tripsinizada e acondicionada em placas de Wells para a diferenciação. Para isso, foram utilizados kits de diferenciação adipogênica e osteogênica^f (Stempro®), com troca do meio a cada 2 a 3 dias. As demonstrações das diferenciações foram realizadas utilizando as

colorações histológicas Oil red e Alizarin red, respectivamente. Para a diferenciação condrogênica, as células foram centrifugadas a 1500 RPM por 10 minutos e o pellet foi cultivado em um tubo Falcon, sendo o meio de diferenciação trocado a cada 2 a 3 dias, durante 21 dias. A demonstração da diferenciação foi realizada pela verificação da deposição de matriz cartilaginosa pela coloração histológica de Alcian Blue, pH 2,5, a partir de lâminas provenientes do pellet fixado com parafina. Como controle negativo, foram cultivadas células com meio de cultura contendo 80% de DMEN baixa glicose/F12, 20% soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (10 µl/ml) e anfotericina B (3µg/ml) para todas as diferenciações.

Citometria de fluxo: a linhagem de CTM-MO foi submetida á técnica de citometria de fluxo (FACS Calibur) após a segunda passagem do cultivo, para se avaliar a expressão de marcadores de superfície de linhagem mesenquimal CD44 e CD105 (positivo) e CD34 (negativo). Foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelos fabricantes de cada um dos anticorpos primários e secundários. Para os marcadores de superfície celular foi utilizado o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG-FITC.

Análise estatística: Os dados referentes à caracterização fenotípica foram submetidos à análise estatística descritiva. Inicialmente a distribuição das variáveis-resposta foi analisada com um dos critérios para escolha do método analítico. Devido à presença de graus variados de assimetria e desvios de um padrão Gaussiano de distribuição, o teste de postos de sinais de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test) para amostras pareadas foi utilizado para realizar comparações entre momentos, dentro de cada grupo. Adicionalmente, o teste da soma de pontos de Wilcoxon (Wilcoxon rank-sum test) foi usado para comparar as medianas das variáveis-resposta entre tratamentos, dentro de cada momento. A análise foi realizada com o procedimento PROC NPAR1WAY (SAS Institute⁹). Significância estatística foi definida como $P < 0.05$.

RESULTADOS

Exame neurológico

Todos os animais hígidos não apresentaram nenhum distúrbio clínico, e os dois cães com trauma medular crônico não evidenciaram melhora nem agravamento do quadro clínico (Figura 1).

Avaliação físico-química, citológica e zimografia das MMP do LCR

Pela análise do LCR no grupo A, só um animal apresentou um discreto incremento no nível de proteína (A2: 28.6 mg/dl) pós-transplante. Foi evidenciada leve pleocitose mista em três pacientes (A1, A2 e A4) notada no momento 2 (Figura 2). Dois cães (B1 e B2) apresentaram hiperproteinorráquia leve no momento 2. Os pacientes B1, B2 e B5 apresentaram pleocitose mista discreta com morfologia celular normal. Os LCR dos animais B2 e B5 contaminaram com sangue periférico no momento da coleta, já que a contagem de hemácias por microlitro foi de 359 e 4800 respectivamente.

A MMP2 latente foi detectada em todas as amostras. A MMP2 ativa foi expressada em um animal (B1), MMP9 latente em quatro cães (A3, A4, B1 e C5) e ativa em seis (A3, B1, B2, B5, C3 e C5) no momento 2 (Figura 3).

Análise estatística

O análise estatístico comparando os grupos A, B e C demonstrou uma significância de $p > 0,05$ para todos os parâmetros clínicos e laboratoriais pré e pós-transplante.

Diferenciações celulares

Diferenciação adipogênica

Para comprovar que as células provenientes da medula óssea aderidas as garrafas de cultivo e com morfologia fibroblastoide são CTM, avaliou-se sua multipotencialidade, mediante a diferenciação em adipócitos. Após nove dias de

cultivo com meio adipogênico Stempro®, as células de medula óssea se diferenciaram em adipócitos e foi observado gradualmente a alteração de sua morfologia fibroblastóide, o núcleo aumentou de tamanho e formaram-se gotículas de gordura. Esta diferenciação se caracterizou mediante a coloração histológica de Oil red (Figura 4).

Diferenciação osteogênica

Para demonstrar a diferenciação, foi utilizado o meio osteogênico Stempro® por 21 dias. A coloração empregada foi Alizarim Red, a qual comprovou os depósitos de cálcio presentes nas células (Figura 5).

Diferenciação condrogênica

Após o cultivo das células em pellet com meio de diferenciação condrogênica, as lâminas foram coradas com Alcian Blue. A demonstração da diferenciação foi realizada pela verificação da reposição de matriz cartilaginosa por a coloração histológica de cor azul (Figura 6).

Citometria de fluxo

O anticorpo negativo para célula mesenquimal utilizado foi o CD34 (Figura 7). Para determinar sua reatividade com células hematopoiéticas da espécie canina, foi testado com sangue periférico e medula óssea da mesma. Foram realizadas citometrias para os anticorpos CD44 e 105 como positivos para célula mesenquimal (Figura 8).

DISCUSSÃO

A utilização da via intratecal como método para terapia celular em neuropatias pode ser vantajosa, já que ao atravessar a barreira hematoencefálica, as células podem ser distribuídas perto do local da lesão, o qual permite potencializar suas propriedades físico-químicas no tecido nervoso (10). O procedimento é semi-invasivo, porém, precisa de anestesia geral, não pode ser utilizado em animais

com contraindicação de punção lombar ou atlanto-occipital, e o volume administrado é limitado.

As alterações evidenciadas no grupo A são compatíveis com uma discreta resposta imune sem repercussões nocivas, já que os demais valores estavam dentro do rango fisiológico e as células não apresentavam reatividade (14). O transplante intratecal de CTM-MO autólogas não evidenciou nenhum tipo de rejeição clínica nem alteração laboratorial importante.

Todos os animais do grupo B toleraram a terapia intratecal alogênica, sem manifestação de sinais clínicos. A hiperproteïnorráquia e pleocitose manifestada no animal B2, e pleocitose no B5, foram devidas a contaminação com sangue periférico. Além disso, não apresentava anormalidades na morfologia celular. O aumento na proteína e contagem celular no LCR do cão B1 podem ser atribuídos aos efeitos parácrinos das CTM-MO, os quais podem gerar uma resposta inflamatória transitória no organismo devido à liberação de citocinas (IL-6 e TNF α -1) (6).

A MMP2 latente foi detectada em todas as amostras pré e pós-transplante e sua variação não foi significativa, similar ao demonstrado por MARIANI, *et al*, (16) o qual identificou a enzima em amostras de LCR tanto de animais saudáveis como com tumores cerebrais. A MMP2 ativa foi expressada em um animal (B1), MMP9 latente em quatro cães (A3, A4, B1 e C5) e ativa em seis (A3, B1, B2, B5, C3 e C5) no momento 2. A mediana do grupo B evidenciou um notável aumento pós-transplante devido a que o paciente B1 teve um considerável incremento nos valores de todas as MMP após terapia celular, já que podem ser secretadas tanto por células inflamatórias como estromais em resposta a injurias exógenas e citocinas (17).

Confrontando os grupos A, B e C, estatisticamente não houve diferença significativa em nenhuma variável avaliada, o que indica que a resposta do organismo ao transplantar CTM-MO autólogas ou alogênicas por via intratecal é

similar comparada com a aplicação de uma solução de PBS pela mesma via nas mesmas condições.

A terapia intratecal de CTM-MO autólogas e alogênicas em cães pode gerar uma resposta inflamatória do organismo leve, a qual pode ser atribuída aos efeitos parácrinos imunomoduladores das CTM-MO transplantadas (6).

O transplante intratecal de CTM-MO autólogas em cães demonstrou ser viável, seguro e minimamente invasivo. Todos os pacientes tratados com células autólogas não apresentaram alterações clínicas neurológicas e do LCR, incluindo a determinação da atividade das MMP2 e 9, como reportado por Maia, *et al*, (18), os quais transplantaram CTM-MO autólogas por via intratecal em equinos sem alterações significativas.

A terapia celular com CTM-MO alogênicas por via intratecal foi tolerada adequadamente em todos os animais tratados, como reportado por Bakshi, *et al*, (10) o qual demonstrou como viável e minimamente invasiva a terapia alogênica intratecal de CTM-MO em ratos.

Em casos de enfermidades neurológicas, o transplante de CTM pode ser feito pela via intratecal, intraventricular, intravenosa ou pela inoculação no local da lesão (19). No entanto, a via intratecal pode ser mais vantajosa por ser menos invasiva e por permitir a passagem das CTM pela barreira hemato-encefálica, potencializando seus efeitos sobre a regeneração tecidual para o tratamento de encefalopatias e/ou mielopatias em cães.

A diferenciação *in vitro* das CTM-MO em células adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas com os meios específicos utilizados, foi corroborado microscopicamente ao demonstrar as características celulares esperadas para cada coloração respectiva.

O anticorpo CD34, negativo para célula mesenquimal e positivo para célula hematopoiética, foi reativo para o sangue periférico e células da medula óssea de cão, comprovando o reconhecimento da espécie; e negativo para as CTM-MO. Os

anticorpos positivos para célula mesenquimal CD44 e 105, expressaram num 52,92% e 63,01% respectivamente com as CTM-MO. Esta expressão é representativa, comparada com o descrito por Anker, *et al*, (20) os quais demonstraram uma expressão positiva menor do 20% para CD105 e negativa para CD34 de CTM-MO.

CONCLUSÕES

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar clínica e laboratorialmente a viabilidade e a segurança do transplante intratecal de células-tronco mesenquimais autólogas e alogênicas provenientes da medula óssea (CTM-MO) de cães, visando sua aplicação futura na terapia celular de enfermidades neurológicas. De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais descritas conclui-se que a via intratecal pode ser utilizada para o transplante de CTM-MO autólogas e alogênicas em cães para poder ser utilizado na rotina veterinária. Contudo, mais pesquisas devem ser realizadas para o estabelecimento de protocolos de terapia celular, de acordo com o tipo de célula-tronco utilizada, via de transplante, quantidade de células transplantadas e frequência de aplicação, visando o tratamento de determinadas enfermidades neurológicas em cães.

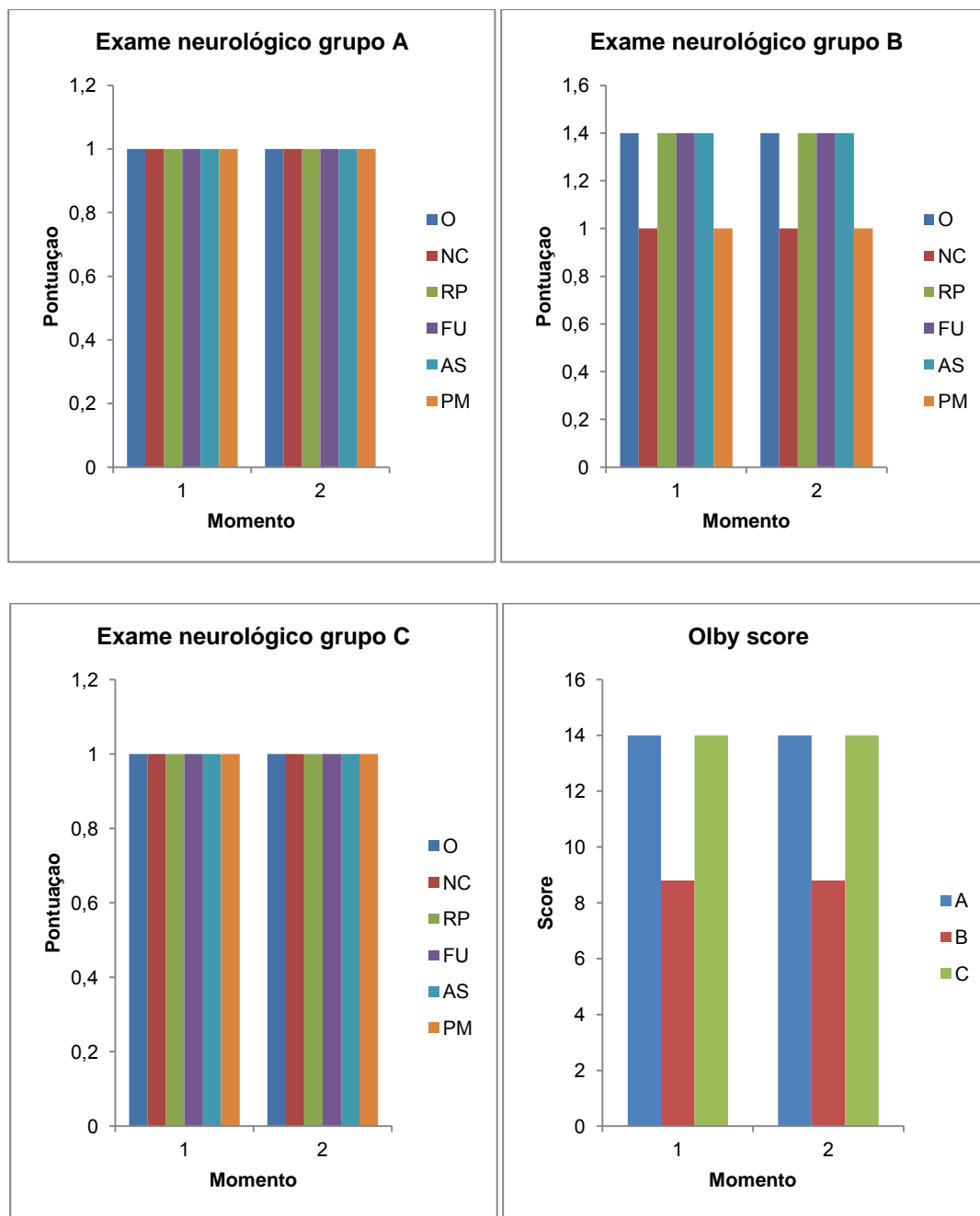


FIGURA 1: Medianas dos parâmetros utilizados no exame neurológico de cada grupo pré e pós-transplante. O: estado mental, NC: nervos craniais, RP: reações posturais, FU: função urinária, AS: avaliação sensitiva, PM: palpação/manipulação.

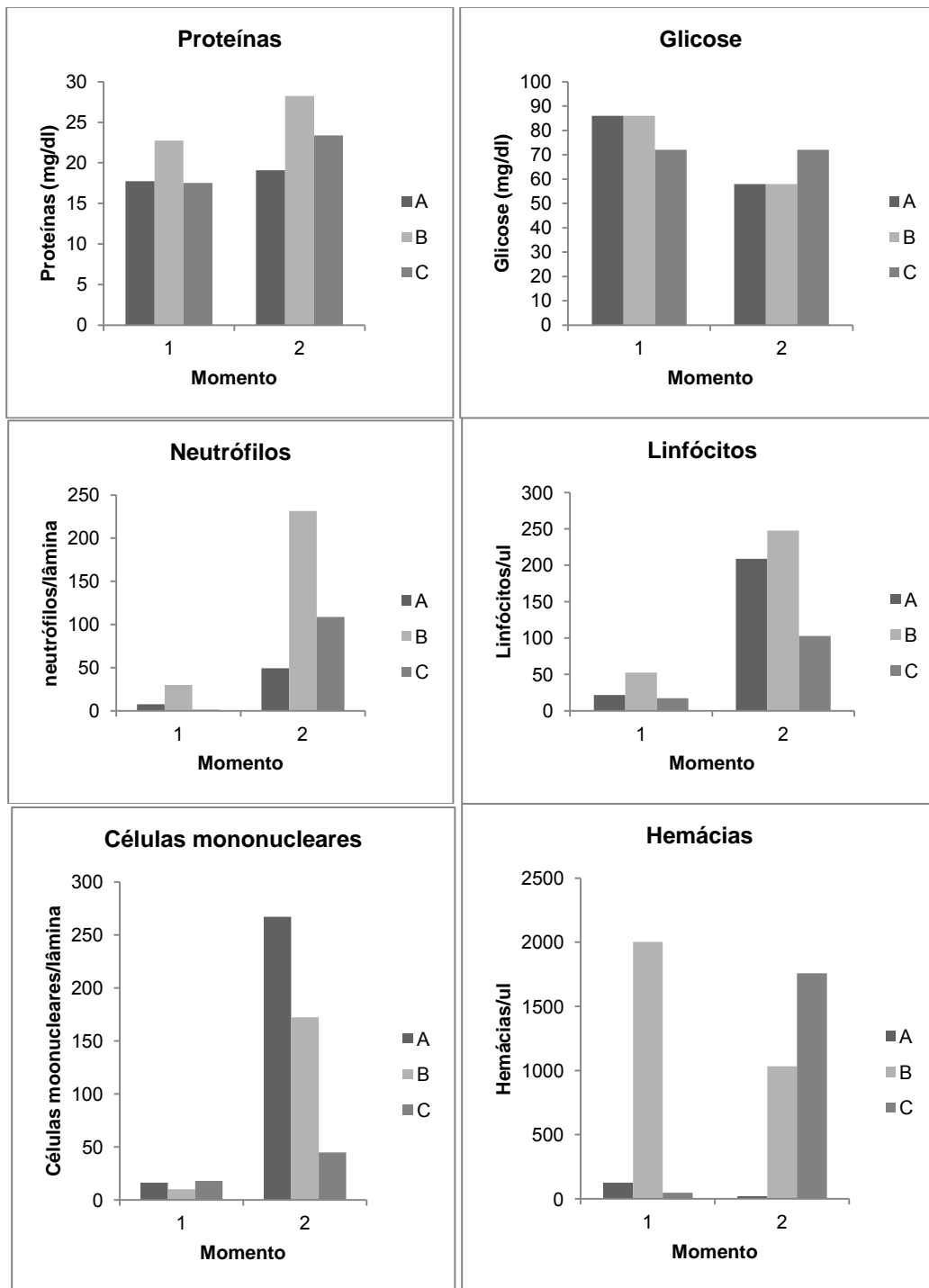


FIGURA 2: Medianas das variáveis físico-químicas e citológicas mais representativas nos momentos 1 e 2 de todos os grupos.

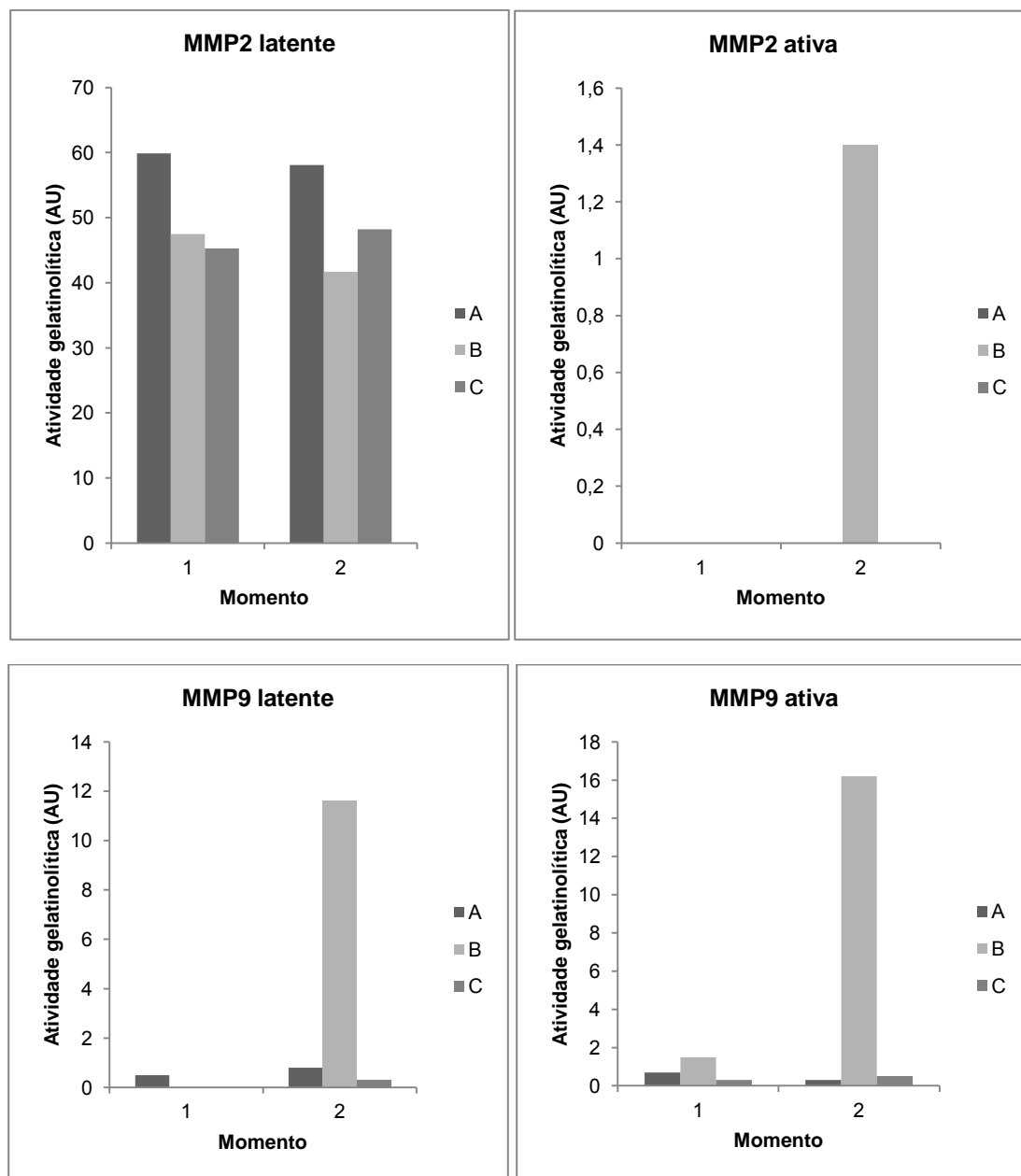


FIGURA 3: Medianas das zimografias de MMP 2 e MMP9 latente e ativa nos momentos 1 e 2 do LCR em todos os grupos.

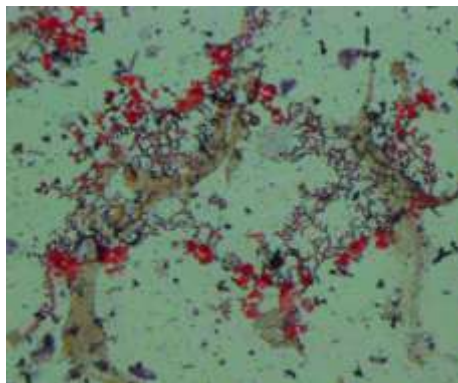


FIGURA 4: Coloração histológica Oil red. Formação de gotículas de gordura (vermelho). 10X.

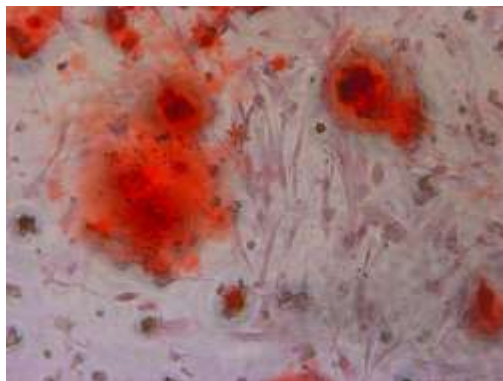


FIGURA 5: Coloração histológica Alizarim red. Formação de depósitos de cálcio (vermelho). 40X.

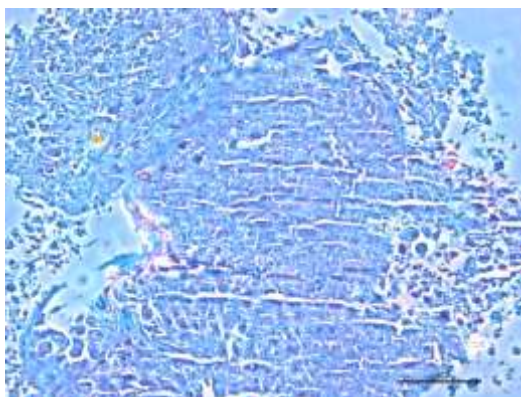


FIGURA 6: Coloração histológica Alcian blue. Matriz cartilaginosa em azul. 10X.

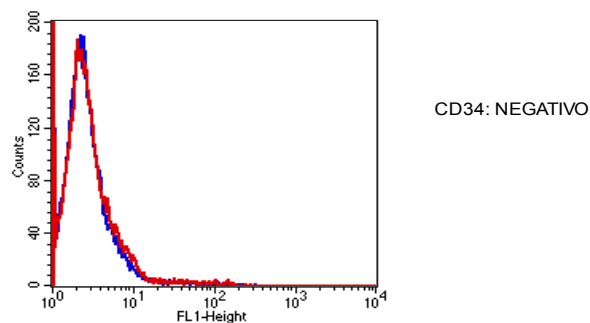


FIGURA 7: Citometria de fluxo do anticorpo CD 34 das CTM-MO.

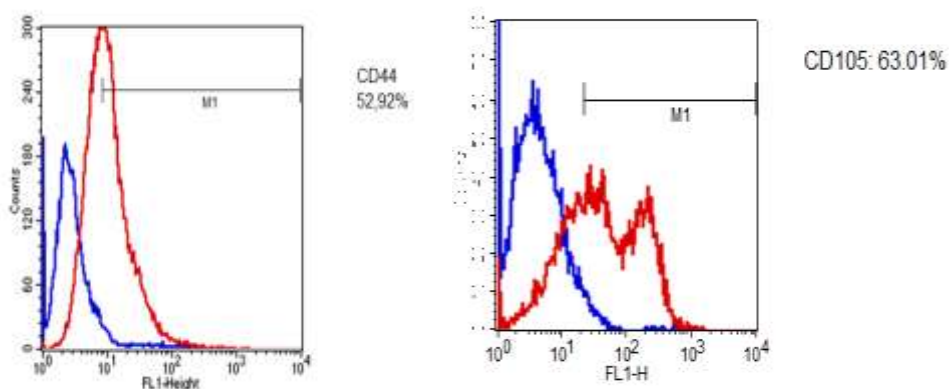


FIGURA 8: Citometria de fluxo dos anticorpos CD 44 e 105 das CTM-MO.

^a Mouse monoclonal anti-CD44, CLONE A3D8. Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

^b Mouse anti-human CD105-FITC (clone SN6, Abcam, FL, USA).

^c Mouse anti-human CD34-FITC (clone 581, BD, USA).

^d Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose . Gibco®.

^e Ficoll- paquetm premium 1073. GE Healthcare Bio-Sciences AB.

^f Kits de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica Stempro®

^g PROC MIXED, SAS Institute, 2009.

BIBLIOGRAFIA

1. Kamishina, H.; Deng, J.; Oji, T.; Cheeseman, J.; Clemmons, R. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res*, v. 67, p.1921–1928, 2006.
2. Pereira, L.V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v.13, n.1, p.7-14, 2008.
3. Jiang, Y.; Jahagirdar, B.N.; Reinhardt, R.L.; Schwartz, R.E.; Keene, C.D.; Ortiz-Gonzalez, X.R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Aldrich, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W.C.; Largaespada, d.a.; verfaillie, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, v. 418, p.41– 49, 2002.
4. HERMANN, A.; GASTL, R.; LIEBAU, S.; POPA, M.O.; FIEDLER, J.; BOEHM, B.O.; MAISEL, M.; LERCHE, H.; SCHWARZ, J.; BRENNER, R.; STORCH, A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.*, v.117, p.411-422, 2004.
5. PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*, v.25, p.2896-2902, 2007.
6. CHEN, Y.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X; DONG, X.J.; ZHANG, G.R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. of Biochem. Cell Biol.*, v.40, p.815-820, 2008.
7. BLACK,L; GAYNOR; J; GAHRING,D; ADAMS,C; ARON,D; HARMAN,S; GINGERICH,D; HARMAN,R. Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet. Ther.* v. 8, n. 4, 2007.
8. ZAMPROGNO, H. Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. *Acta Scient Vet.*, v. 35, Supl. 2, p.289-290, 2007.
9. LIM, JI-HEY; BYEON, YE-EUN; RYU, HAK-HYUN; JEONG, YUN-HYEOK; LEE, YOUNG-WON; KIM, WAN HEE; KANG, KYUNG-SUN; KWEON, OH-KYEONG. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived

- mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dog. *J. Vet. Sci.* v. 8, n. 3, p275-282, 2007.
10. BAKSHI, A.; BARSHINGER, A.; SWANGER, S.; MADHVANI, V.; SHUMSKY, J.; NEUHUBER, B.; FISCHER, I. Lumbar Puncture Delivery of Bone Marrow Stromal Cells in Spinal Cord Contusion: A Novel Method for Minimally Invasive Cell Transplantation. *J. of Neurotrauma*, v. 23, n. 1, p. 55–65. 2006.
 11. PLATT, S.R., OLBY, N.J. Neurological emergencies. In: Platt SR, Olby NJ (eds), *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology* 3rd edn. British Small Animal Veterinary Association, 2004.
 12. DE LAHUNTA, A.; GLASS, E. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*, 3rd Edition. 2010.
 13. OLBY, N.; DE RISIO, L.; MUÑANA, K.; WOSAR, M.; SKEEN, T.; SHARP, N.; KEENE, B. Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. *Am. J. Vet. Res.*, v. 62, p.1624–1628. 2001.
 14. WAMSLEY, H.; ALLEMAN, A. Clinical pathology. In: PLATT, S.R., OLBY, N.J. *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology* 3rd edn. England. 2004, Part 1, p: 35-53.
 15. MACHADO, G; DE MELO, G; MORAES O; SOUZA, M; MARCONDES, M; PERRI, S; VASCONCELOS, R. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Araçatuba, SP, Brasil. 2010.
 16. MARIANI, C.; BOOZER, L.; BRAXTON, A.; PLATT, S.; VERNAU, K.; MCDONNELL, J.; GUEVAR, J. Evaluation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the cerebrospinal fluid of dogs with intracranial tumors. *Am. J. Vet. Res.*, v. 74, p.122–129. 2013.
 17. ELKINGTON, P.; O’KANE, C.; FRIEDLAND, J. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 142, p. 12–20. 2005.

- 18.** Biblioteca virtual FAPESP. Coleta, processamento, caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais e sua viabilidade de aplicação por via intratecal em equinos. Available at: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/108861/coleta-processamento-caracterizacao-fenotipica-das-celulas-tronco-mesenquimais-e-sua-viabilidade-de/> . Accessed Mai 13, 2013.
- 19.** ROISEN, F.J.; KLUEBER, K.M.; LU, C.L.; HATCHER, L.M.; DOZIER, A.; SHIELDS, C.B.; MAGUIRE, S. Adult human olfactory stem cells. *Brain Research*, v.890, n.1, p.11-22, 2001.
- 20.** Anker, P.; Noort, W.; Scherjon, S.; *et. al.* Mesenchymal stem cells in human second- trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*, 2003; 88:845-852.

CAPÍTULO 3

CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais descritas conclui-se que a via intratecal para o transplante de CTM-MO autólogas e alogênicas em cães é viável e segura, pois demonstrou ser minimamente invasiva, rápida e permite transplantar um grande número de células no espaço subaracnoideo.

As células utilizadas neste estudo apresentaram características proliferativas, morfológicas, imunofenóticas e de multipotencialidade demonstradas pela constante auto-renovação, aderência ao plástico, formato fibroblastóide, positividade para os anticorpos CD44 e CD105, negatividade para o CD34, e diferenciação positiva, in vitro, adipogênica, condrogênica e osteogênica.

Nos dois pacientes com trauma medular crônico, um único transplante de $1,5 \times 10^6$ CTM-MO alogênicas por via intratecal não ocasionou melhora detectável pelo exame neurológico.

A possibilidade de transplante intratecal de CTM-MO alogênicas de cães abre perspectivas para a implantação de bancos de células para o tratamento imediato de determinadas enfermidades neurológicas em cães.

Contudo, antes da indicação clínica deste tipo de terapia celular, mais pesquisas devem ser realizadas para o estabelecimento de protocolos de acordo com o tipo de célula-tronco utilizada, via de transplante, quantidade e frequência das células transplantadas, visando a comprovação da eficácia desta terapia no tratamento de cães com problemas neurológicos.

BIBLIOGRAFIA

ANKER, P.; NOORT, W.; SCHERJON, S.; *et. al.* Mesenchymal stem cells in human second- trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*, v.88, p.845-852. 2003.

ARINZEH T. L; PETER S; ARCHAMBAULT M; VAN DEN BOS C; GORDON S; KRAUS K; SMITH A; KADIYALA S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in: A critical-sized canine segmental defect. *J. Bone and Joint Surg. Am.*, v. 85A, n.10, p.1925-1935, 2003.

BAKSHI, A.; BARSHINGER, A.; SWANGER, S.; MADHVANI, V.; SHUMSKY, J.; NEUHUBER, B.; FISCHER, I. Lumbar Puncture Delivery of Bone Marrow Stromal Cells in Spinal Cord Contusion: A Novel Method for Minimally Invasive Cell Transplantation. *J. of Neurotrauma*, v. 23, n. 1, p. 55–65. 2006.

BLACK,L; GAYNOR; J; GAHRING,D; ADAMS,C; ARON,D; HARMAN,S; GINGERICH,D; HARMAN,R. Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet. Ther.* v. 8, n. 4, 2007.

BORJESSON, D.L; PERONI, J.F. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. *Clin. Lab. Med.*, v. 31, p. 109-123, 2011.

CHEN, Y.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X; DONG, X.J.; ZHANG, G.R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. of Biochem. Cell Biol.*, v.40, p.815-820, 2008.

CHUNG, D.-J; CHOI, C-B; LEE, S-H; KANG, E.-H; LEE, J.-H; HWANG, S.-H; HAN, H; LEE, J.-H; CHOE, B.-Y; LEE, S.-Y; KIM, H.-Y. Intraarterially delivered human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in canine cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.*, v. 87, n. 16, p. 3554–3567, 2009.

DAHLGREN, L.A. Stem Cell Therapy. In: ROBINSON, N.E.; SPRAYBERRY, K.A. Current therapy in equine medicine. 6. ed. St. Louis: Saunders, 2009. cap. 199, p. 908-911.

DE LAHUNTA, A.; GLASS, E. Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology, 3rd Edition. 2010.

ELKINGTON, P.; O'KANE, C.; FRIEDLAND, J. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 142, p. 12–20. 2005.

FEITOSA, M.M. Exames complementares. In: FEITOSA, F.L.F. Semiologia Veterinária. 1 ed. São Paulo: Roca, 2004. p.527-538.

FLORES–FIGUEROA, E; MONTESINOS, J. J; MAYANI, H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev. Invest. clin.* v.58 n.5, 2006.

FOX, J.M. Recent advance into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Bri. J. Haematol.*, v.137, p.491-502, 2007.

FRIEDENSTEIN, A.J.P.; PETROKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of boné marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v.16, p. 381-390. 1966

GAO, J.; CAPLAN, A.L. Mesenchymal stem cells and tissue engineering for orthopaedic surgery. *Cir. Organ. Mov.*, v.88, p.305-316, 2003.

HAAS, S.; WEIDENER, N.; WINKLER, J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr. Opin. Neurol.*, v.18, p.59-64, 2005.

HECKLER, M; PEREZ, F; VALERIANO, R; VERDUGO, M; WODEWOTZKY, T; MACHADO, V; DA CRUZ, F; MARTINS, R. Perineural mesenchymal stem cells inoculation on the sciatic nerve of a dog. In: Braziliam congress on stem cells and cell therapy.7, 2012, São Paulo. Abstracts, São Paulo, Brazil, 2012.

HERMANN, A.; GASTL, R.; LIEBAU, S.; POPA, M.O.; FIEDLER, J.; BOEHM, B.O.; MAISEL, M.; LERCHE, H.; SCHWARZ, J.; BRENNER, R.; STORCH, A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.*, v.117, p.411-422, 2004.

HERNANDEZ, P. Medicina regenerativa II. Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular. La Habana, Cuba. Instituto de Hematología e Inmunología, 2006. Acceso em: 02/12/2012. Disponible em: <http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol22_1_06/hih01106.htm>.

HIYAMA, A; JOJI, M; TORU, I; HIROKO, O; TAKUYA, W; KENJI, S; FUTOSHI, T; DAISUKE, S. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J. Orthop. Res.*, v. 26, n. 5, p. 589–600, 2008.

HUI, J; THAMBYAH, A; LEE, E. Treatment of Chondral Lesions in Advanced Osteochondritis Dissecans: A Comparative Study of the Efficacy of Chondrocytes, Mesenchymal Stem Cells, Periosteal Graft, and Mosaicplasty (Osteochondral Autograft) in Animal Models. *J. Pediat. Orthop.*, v. 24, n.4, p. 427-433, 2008.

HUSS, R.; LANGE, C.; WEISSINGER, E.; KOLB, H.; THALMEIERA, K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34–/low hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem cells*, v.18, p.252-260, 2000.

JAFARIAN, M; ESLAMINEJAD, M; KHOJASTEH, A. Marrow derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.105, p.14–24, 2008.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L.; SCHWARTZ, R.E.; KEENE, C.D.; ORTIZ-GONZALEZ, X.R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; ALDRICH, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W.C.; LARGAESPADA, D.A.; VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, v. 418, p.41– 49, 2002.

KAMISHINA, H.; DENG, J.; OJI, T.; CHEESEMAN, J.; CLEMMONS, R. Expression of neural markers on bone marrow–derived canine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.*, v. 67, p.1921–1928, 2006.

KIM, J; LEE, J; LYOO, Y; JUNG, D; PARK, H. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Vet. Dermatolo.* 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/vde.12011>>. Acesso em: 01 mar 2013.

KIRSCHSTEIN, R.; SKIRBOLL, L. R. Stem cells: scientific progress and future research directions. Washington: National Institutes of Health, 2001. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport>>. Acesso em: 20 nov 2012.

KORBLING, M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept?. *N. Engl. J. Med.*349:570-82, 2003.

KRAUS, K.H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.*, v. 32, p. 232-242, 2006.

LEE, J. H.; CHUNG, W.H.; KANG, E. H.; CHUNG, D.J.; CHOI, C.B.; CHANG, H.S.; LEE, J. H.; HWANG, S.H.; HAN, H.; CHOE, B.Y.; KIM, H.Y. Schwann cell-like remyelination following transplantation of human umbilical cord blood (hUCB)-derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. *J. Vet. Sci.* v. 8 n. 3, p.275–282, 2010.

LEUNG, V.Y.L; CHAN, D.; CHEUNG, K.M.C. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur. Spine J.* v.15, n. 3, p. 406-413, 2006.

LIM, JI-HEY; BYEON, YE-EUN; RYU, HAK-HYUN; JEONG, YUN-HYEOK; LEE, YOUNG-WON; KIM, WAN HEE; KANG, KYUNG-SUN; KWEON, OH-KYEONG. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dog. *J. Vet. Sci.* v. 8, n. 3, p275-282, 2007.

MACHADO, G; DE MELO, G; MORAES O;SOUZA, M; MARCONDES, M; PERRI,S; VASCONCELOS, R. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Araçatuba, SP, Brasil. 2010.

MARCONDES, M.. Avaliação física, citológica e bioquímica do líquido cefalorraquidiano de cães normais e de cães jovens portadores de cinomose. Botucatu, 1992. 84p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MARIANI, C.; BOOZER, L.; BRAXTON, A.; PLATT, S.; VERNAU, K.; MCDONNELL, J.; GUEVAR, J. Evaluation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the cerebrospinal fluid of dogs with intracranial tumors. *Am. J. Vet. Res.*, v. 74, p.122–129. 2013.

NARDI, N.B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. *Genét Escola*, p.25-29, 2007. Disponível em: <<http://www.sbg.org.br/GeneticaEscola2/web/ano2vol2/05.pdf>>. Acesso em 2 jun. 2012.

NOTH, U. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 62, p. 765-783, 2010.

ODORICO, J.S.; KAUFMAN, D.S.; THOMSON, J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.*, v. 19, p.193–204, 2001.

OLBY, N.; DE RISIO, L.; MUÑANA, K.; WOSAR, M.; SKEEN, T.; SHARP, N.; KEENE, B. Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. *Am. J. Vet. Res.*, v. 62, p.1624–1628. 2001.

PARR, A.M.; TATOR, C.H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow transplant.*, v. 40, p.609-619, 2007.

PELLEGRINO, F.; SURANITI, A; GARIBALDI, L. Neurología para la práctica clínica. Buenos Aires: Inter-Médica, 2003. 720p.

PEREIRA, L.V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v.13, n.1, p.7-14, 2008.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*, v.25, p.2896-2902, 2007.

PITTENGER, M.F., MACKAY, A.M., BECK, S.C. JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. Multilineage potencial of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p.143-147, 1999.

PLATT, S.R., OLBY, N.J. Neurological emergencies. In: Platt SR, Olby NJ (eds), *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology* 3rd edn. British Small Animal Veterinary Association, 2004.

RASKIN, R.; MEYER, D. Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide. 2.ed. Missouri: Elsevier, 2010. 450p.

RICE, C.M, SCOLDING, N.J. Adult stem cells – reprogramming neurological repair?. *Lancet*, 363:193-9, 2004.

ROISEN, F.J.; KLUEBER, K.M.; LU, C.L.; HATCHER, L.M.; DOZIER, A.; SHIELDS, C.B.; MAGUIRE, S. Adult human olfactory stem cells. *Brain Research*, v.890, n.1, p.11-22, 2001.

RYU, HAK-HYUN; LIM, JI-HEY; YE-EUN BYEON; JEONG-RAN PARK; MIN-SOO SEO; YOUNG-WON LEE; WAN HEE KIM; KYUNG-SUN KANG; OH-KYEONG KWEON. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *J. Vet. Sci.*, v. 10, n. 4, p.273-284, 2009.

SAMPAOLESI, M.; BLOT, S.; D'ANTONA, G.; GRANGER, N.; TONLORENZI, R.; INNOCENZI, A.; MOGNOL, P.; THIBAUD, J.L.; GALVEZ, B.G.; BARTHÉLÉMY, I.; PERANI, L.; MANTERO, S.; GUTTINGER, M.; PANSARASA, O.; RINALDI, C.; CUSELLA, D.E.; ANGELIS, M.G.; TORRENTE, Y.; BORDIGNON, C.; BOTTINELLI, R.; COSSU, G. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*, v. 444, n. 30, 2006.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J. Bras. Neurocir.*, v. 16, n.1, p. 13-19, 2005.

SILVA, GUILLERME, SILVIO LITOVSKY, JOAO A.R. ASSAD, ANDRE L.S. SOUSA, BRADLEY J. MARTIN, DEBORAH VELA, STEPHANIE C. COULTER, JING LIN, JUDY OBER, WILLIAM K. VAUGHN, RODRIGO V.C, BRANCO, EDIE M. OLIVEIRA, RUMIN HE, YONG-JIAN GENG, JAMES T. WILLERSON, EMERSON C. PERIN. Mesenchymal Stem Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Canine Chronic Ischemia Model. *Circulation*, v. 111, p.150-156, 2005.

SPENCER, N.; GIMBLE, J.M.; LOPEZ, M.J. Mesenchymal Stromal Cells: Past, Present, and Future. *Vet. Surg.*, v. 40, p.129–139, 2011.

SULLIVAN, C.O. Stem Cells, 2005. Disponível em: <http://randwickequine.com.au/services/stem_cell_therapy>. Acesso em 2 dez. 2011.

TAUPIN, P. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: Functionality and potential clinical interest. *Med. Sci. Monit.*, 11:RA 247-52, 2005.

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S, WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.A.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, v. 282, p.1145–1147, 1998.

TONDREAU, T. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells*, v.23, n.8. p.1105-1112, 2005.

VALDÉS, C. M., PASCUAL, F. D., PROSPER, C. F., MORENO M. J., GARCÍA O. D., GARCIA, A.J.A. Medicina regenerativa con células madre adultas. *Rev. Clin. Esp.*, 205:556-64, 2005.

WAMSLEY, H.; ALLEMAN, A. Clinical pathology. In: PLATT, S.R., OLBY, N.J. BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology 3rd edn. England. 2004, Part 1, p: 35-53.

WILSON, E. The cell in Development and Inheritance, MacMillan, London, 1896.

WOO, S.L.; HILDEBRAND, K.; WATANABE, N.; FENWICK, J.A; PAPAGEORGIOU, C.D.; WANG, J.G. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.367, p.312-323, 1999.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso. Disponível em: <<http://www.ifhc.org.br/files/apresentacoes/1936.pdf>> acesso em 15 nov. 2012.

ZAMPROGNO, H. Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. *Acta Scient Vet.*, v. 35, Supl. 2, p.289-290, 2007.

Anexos

Anexo 1: Pontuação Olby.

Stage 1

- 0—No pelvic limb movement and no deep pain sensation.
- 1—No pelvic limb movement with deep pain sensation.
- 2—No pelvic limb movement but voluntary tail movement.

Stage 2

- 3—Minimal non-weight-bearing protraction of the pelvic limb (movement of 1 joint).
- 4—Non-weight-bearing protraction of the pelvic limb with > 1 joint involved < 50% of the time.
- 5—Non-weight-bearing protraction of the pelvic limb with > 1 joint involved > 50% of the time.

Stage 3

- 6—Weight-bearing protraction of pelvic limb < 10% of the time.
- 7—Weight-bearing protraction of pelvic limb 10 to 50% of the time.
- 8—Weight-bearing protraction of pelvic limb > 50% of the time.

Stage 4

- 9—Weight-bearing protraction 100% of the time with reduced strength of pelvic limb. Mistakes > 90% of the time (eg, crossing of pelvic limbs, scuffing foot on protraction, standing on dorsum of foot, falling).
- 10—Weight-bearing protraction of pelvic limb 100% of the time with reduced strength. Mistakes 50 to 90% of the time.
- 11—Weight-bearing protraction of pelvic limb 100% of the time with reduced strength. Mistakes < 50% of the time.

Stage 5

- 12—Ataxic pelvic limb gait with normal strength, but mistakes > 50% of the time (eg, lack of coordination with thoracic limb, crossing of pelvic limbs, skipping steps, bunny-hopping, scuffing foot on protraction).
- 13—Ataxic pelvic limb gait with normal strength, but mistakes made < 50% of the time.
- 14—Normal pelvic limb gait.

Anexo 2: exame neurológico de cada animal dos grupos A, B e C pré e pós-transplante. P: paciente, M: momento, O: estado mental, NC: nervos craniais, RP: reações posturais, FU: função urinária, AS: avaliação sensitiva, PM: palpação/manipulação.

P	M	O	NC	RP	FU	AS	PM	Olby
A1	1	1	1	1	1	1	1	14
A2	1	1	1	1	1	1	1	14
A3	1	1	1	1	1	1	1	14
A4	1	1	1	1	1	1	1	14
A5	1	1	1	1	1	1	1	14
A1	2	1	1	1	1	1	1	14
A2	2	1	1	1	1	1	1	14
A3	2	1	1	1	1	1	1	14
A4	2	1	1	1	1	1	1	14
A5	2	1	1	1	1	1	1	14
B1	1	2	1	2	2	2	1	1
B2	1	2	1	2	2	2	1	1
B3	1	1	1	1	1	1	1	14
B4	1	1	1	1	1	1	1	14
B5	1	1	1	1	1	1	1	14
B1	2	2	1	2	2	2	1	1
B2	2	2	1	2	2	2	1	1
B3	2	1	1	1	1	1	1	14
B4	2	1	1	1	1	1	1	14
B5	2	1	1	1	1	1	1	14
C1	1	1	1	1	1	1	1	14
C2	1	1	1	1	1	1	1	14
C3	1	1	1	1	1	1	1	14
C4	1	1	1	1	1	1	1	14
C5	1	1	1	1	1	1	1	14
C1	2	1	1	1	1	1	1	14
C2	2	1	1	1	1	1	1	14
C3	2	1	1	1	1	1	1	14
C4	2	1	1	1	1	1	1	14
C5	2	1	1	1	1	1	1	14

Anexo 3: exame físico-químico e citológico do LCR dos grupos A, B e C pré e pós-transplante. M: momento. VOL: volume. ASP: aspecto. D.E: densidade específica. COAG: coagulação. PROT: proteína. GLIC: glicose. S.O: sangue oculo. HEM: hemácias. C.N: células nucleadas. NEUT: neutrófilos/lâmina. LINFO: linfócitos/lâmina. C.M: células mononucleadas/lâmina.

ID	M	VOL (ml)	COR	ASP	D.E	COAG	Ph	PROT(mg/dl)	GLIC (+)	S.O(+)	PANDY	HEM/ μ l	C.N/ μ l	NEUT	LINFO	C. M.
A1	1	1	0	0	1006	0	9	17,2	2	1	0	2	1	6	34	5
A1	2	1,5	0	0	1006	0	9	19	1	1	0	3	1	3	139	18
A2	1	2	0	1	1006	0	9	16,8	2	4	0	619	1	32	26	17
A2	2	2,5	2	2	1006	0	9	28,6	2	4	0	4	8	77	550	652
A3	1	1	0	0	1006	0	9	17	1	0	0	1	0	0	12	7
A3	2	2	0	0	1006	0	9	17,6	1	1	0	5	1	0	33	31
A4	1	2	0	0	1006	0	8	20,4	2	0	0	0	0	0	3	5
A4	2	1	0	0	1004	0	9	18,5	1	1	0	88	8	166	320	614
A5	1	1	0	0	1006	0	9	17,3	2	0	0	3	1	0	34	48
A5	2	1,5	0	0	1006	0	9	11,7	2	0	0	3	2	0	2	20
B1	1	2	0	0	1006	0	8	17,1	2	1	0	15	0	0	4	1
B1	2	1	0	0	1006	0	9	42,6	1	3	0	5	7	604	9	34
B2	1	2	0	0	1006	0	8	21,5	1	1	0	4	0	0	16	6
B2	2	2	0	0	1006	0	8	34	1	4	0	359	8	179	857	243
B3	1	1,5	0	0	1004	0	9	11,7	2	0	0	0	0	0	1	7
B3	2	1,5	0	0	1006	0	8	19,8	2	1	0	0	1	38	64	42
B4	1	1,5	0	0	1006	0	9	12,6	2	1	0	0	1	0	2	3
B4	2	1,5	0	0	1006	0	8	14,2	1	0	0	1	1	0	56	36
B5	1	2	2	1	1006	0	9	31	2	4	0	10000	3	149	240	33
B5	2	2	2	1	1006	0	9	30,6	2	4	0	4800	5	336	160	160
C1	1	1	0	0	1008	0	8	15,4	2	0	0	1	1	1	42	10
C1	2	1	0	0	1004	0	9	13,3	2	0	0	0	1	0	99	59
C2	1	1	0	0	1006	0	8	10,6	2	0	0	1	2	0	27	51
C2	2	2	0	0	1006	0	9	21,4	1	1	0	1	1	2	100	56
C3	1	0,5	0	0	1006	0	9	21	2	4		230	0	5	16	10
C3	2	1,5	0	0	1004	0	8	38,3	2	3	0	440	1	3	4	2
C4	1	2,5	0	0	1006	0	8	28	1	0	0	0	0	0	1	3
C4	2	0,5	0	0	1004	0	9	13,7	1	1	0	0	2	1	4	2
C5	1	2	0	0	1006	0	8	12,7	1	0	0	0	2	0	1	15
C5	2	3	1	2	1006	0	9	30,2	2	4	0	8350	6	537	307	105

Anexo 4: Zimografia das MMP2 e 9 do LCR.