

Ricardo Corrêa da Cunha

**EFEITOS FUNCIONAIS DA TERAPIA AUTÓLOGA DE  
CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA  
(CD45<sup>+</sup> E CD34<sup>-</sup>) NO TRAUMA RAQUIMEDULAR  
AGUDO NOS MURINOS: SEDENTÁRIOS E  
TREINADOS FÍSICOS**

Dissertação de Mestrado defendida  
como pré-requisito para a obtenção do  
título de Mestre em Educação Física, no  
Departamento de Educação Física,  
Setor de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná.

**Ricardo Corrêa da Cunha**

**EFEITOS FUNCIONAIS DA TERAPIA AUTÓLOGA DE  
CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA  
(CD45<sup>+</sup> E CD34<sup>-</sup>) NO TRAUMA RAQUIMEDULAR AGUDO  
NOS MURINOS: SEDENTÁRIOS E TREINADOS FÍSICOS**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadores: Prof. Dr. Raul Osiecki  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho

*"A medicina experimental é uma medicina científica, que é fundada na fisiologia e que tem por objetivo encontrar as leis da função do corpo vivo para poder as reger e modificar no interesse da saúde do homem".*

Claude Bernard (1947). Princípios de Medicina Experimental.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ana Lúcia e Luiz António, pela minha Vida, pela amizade,  
exemplo e dedicação durante minha vida pessoal e profissional.  
Aos meus irmãos, Rafael e Roberta, meus melhores amigos, sempre prontos e  
dispostos a me ajudar.  
Ao mais novo membro da família, Pedro (Pedrinho), pelos momentos de  
descontração.  
À Simone, pelo carinho e paciência durante este processo que resultou nesta  
Dissertação.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos Orientadores Prof. Dr. Raul Osiecki e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, pela confiança, oportunidade, estímulo, apoio e por não medirem esforços para que as dificuldades fossem superadas.

Ao Dr. Emiliano Neves Vialle, pelas várias manhãs de sábado e segunda-feira fazendo a pesquisa, junto com seus “fellows”, o meu obrigado pela orientação do modelo experimental de lesão medular, pelos ensinamentos em cirurgia experimental e pelo aquário para o treinamento dos animais.

Ao parceiro e grande amigo Doutorando Júlio César Francisco, pelas inúmeras participações durante todo o processo da pesquisa, das mais complexas como: punção e isolamento das células; as mais simples como: carona para transportar os animais.

À Doutoranda Rossana Baggio Simeoni, pela impecável participação no isolamento das células, prestando inestimável contribuição para esta pesquisa.

Ao Graduando de Medicina da PUCPR, Guilherme Henrique Gonçalves Moreira, pela participação no estudo e pela paciência e capacidade de ensinar a manipulação dos animais no início de todo o processo.

Ao Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza, pela oportunidade de desenvolver a pesquisa e auxílio durante todo o processo inicial do mestrado.

Ao Prof. Dr. André Rodacki, pela contribuição científica para o estudo.

À Larissa Zocche, pelo auxílio no isolamento das células.

À Márcia Olandoski, pelo auxílio nos procedimentos estatísticos deste estudo.

Ao Mestrando em Educação Física da UFPR, André Fornaziero, pelas inestimáveis contribuições com os dados estatísticos e pela parceria durante os treinamentos dos animais.

Aos Graduandos em Educação Física, Luis Felipe e Rafaela, pela parceria durante os treinamentos dos animais.

À Mestre Ana Paula Camargo Martins, pelo auxílio na preparação e no estudo histopatológico da lesão medular experimental.

Aos responsáveis pelo Biotério central da UFPR e Biotério da PUCPR, Luis e Cândido, pelos trabalhos prestados.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

**À DEUS, pela minha saúde e disposição para concluir mais uma etapa em  
minha vida.**

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	ESTRUTURA NEURAL .....	04
FIGURA 2 –	ESTRUTURA DA PLACA MOTORA .....	07
FIGURA 3 –	ORGANIZAÇÃO NEURAL DA SUBSTÂNCIA CINZENTA .....	10
FIGURA 4 –	DESENVOLVIMENTO DA MEDULA ESPINHAL .....	11
FIGURA 5 –	CLASSIFICAÇÃO DA LESÃO MEDULAR .....	19
FIGURA 6 –	DESENHO EXPERIMENTAL .....	28
FIGURA 7 –	ASPECTO DA MEDULA PÓS-LAMINECTOMIA EM T10 .....	30
FIGURA 8 –	APARELHO INYU .....	31
FIGURA 9 –	GRÁFICO QUE REPRESENTA AS CURVAS PRODUZIDAS PELO IMPACTO .....	32
FIGURA 10 –	GRÁFICO AMPLIADO QUE DESTACA, A PARTIR DO PONTO DE IMPACTO, AS CURVAS V E CS .....	33
FIGURA 11 –	ESTRUTURA MEDULAR .....	37
FIGURA 12 –	DESENHO, MOSTRANDO ÁREAS SELECIONADAS PARA ESTUDO HISTOPATOLÓGICO .....	43
FIGURA 13 –	IMAGEM DE CORTE HISTOPATOLÓGICO .....	52
FIGURA 14 –	IMAGEM DE CORTE HISTOPATOLÓGICO .....	53
FIGURA 15 –	IMAGEM DE CORTE HISTOPATOLÓGICO .....	54
FIGURA 16 –	IMAGEM DE CORTE HISTOPATOLÓGICO .....	55
FIGURA 17 –	IMAGEM DE CORTE HISTOPATOLÓGICO .....	55
FIGURA 18 –	IMAGEM DE CORTE HISTOPATOLÓGICO .....	56
FIGURA 19 –	LINHAGEM HEMATOPOIÉTICA .....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA PRIMEIRA AVALIAÇÃO DA ESCALA BBB PARA OS QUATRO GRUPOS .....	48
GRÁFICO 2 –	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA ÚLTIMA AVALIAÇÃO DA ESCALA BBB PARA OS QUATRO GRUPOS .....	49
GRÁFICO 3 –	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DIFERENÇA (FINAL – INÍCIO), AVALIAÇÃO DA ESCALA BBB PARA OS QUATRO GRUPOS .....	50

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	28
TABELA 2 –	VALORES PADRONIZADOS DE LESÃO COM O INYU .....	33
TABELA 3 –	VALORES DA LESÃO DO INYU .....	45
TABELA 4 –	AVALIAÇÃO FUNCIONAL B.B.B. (INÍCIO) .....	46
TABELA 5 –	AVALIAÇÃO FUNCIONAL B.B.B. (FINAL) .....	47
TABELA 6 –	AVALIAÇÃO FUNCIONAL B.B.B. (DIFERENÇA) .....	47
TABELA 7 –	AVALIAÇÃO FUNCIONAL B.B.B. (DIFERENÇA) EM PERCENTUAL .....	47
TABELA 8 –	VALORES REFERENTES À CONCENTRAÇÃO DE LACTATO .....	51



## RESUMO

A terapia celular e o exercício físico podem ser uma opção para regeneração da lesão medular espinal traumática. Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos funcionais da terapia autóloga de células-tronco derivadas da medula óssea: fração mononuclear no trauma raquimedular agudo em ratos sedentários e treinados. Foram utilizados 70 ratos Wistar, machos, submetidos à lesão medular contusa por impacção (Impactor NYU). Após este procedimento, os animais foram acompanhados e avaliados quanto à função motora com o auxílio da escala de BBB a cada 48 horas por 48 dias. Os animais com o escore  $\leq 08$  foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (N=48): Grupo 01, *Sedentário e sem injeção intraparequimatosa de células* (N=12); grupo 02, *Sedentário e com injeção de células* (N=12); grupo 03, *Exercício e sem injeção de células* (N=12) e o grupo 04, *Exercício e injeção de célula* (N=12). As células-tronco mononucleares adultas (CD45<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup>) obtidas e isoladas por punção-aspiração da medula óssea. O treinamento físico realizado em um tanque. Após adaptação ao meio líquido, iniciou-se o treinamento: natação 6 vezes por semana durante 60 min. diários e por 6 semanas. O estudo foi duplo-cego. Avaliação estatística: Para as comparações entre os grupos em relação às diferenças entre a avaliação inicial e a avaliação final foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e post-hoc U Mann-Whitney seguido da correção do nível do  $p$  pelo teste de Bonferroni ( $p < .008$ ) para valores significativos. Foi demonstrada diferença estatística significativa:  $p < .008$  para o grupo Treinado com células-tronco em relação aos demais grupos, principalmente no terceiro momento (diferença). A conclusão foi que a combinação da terapia celular por células-tronco da medula óssea (CD45<sup>+</sup>/ CD34<sup>-</sup>) e exercício físico resultaram em um aumento funcional significativo na lesão medular espinal traumática aguda.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lesão medular espinal traumática, terapia celular, células-tronco derivadas da medula óssea, exercício físico, ratos.

## ABSTRACT

Cell therapy and exercise training could be an option to spinal cord regeneration. This study aims to evaluate the functional effects of the autologous bone marrow stem cells (CD45<sup>+</sup>/ CD34<sup>-</sup>) transplantation in the acute spinal cord injury: in exercise training and sedentary rats. Seventy adults, male Wistar rats were submitted to spinal cord contusion by Impactor (NYU). Locomotor rating scale was done each 48 hours by 48 days. The animals with ~~score~~ were divided randomly in four groups (N=48): Group 01, *sedentary without cells parenchyma infusion* (N=12); group 02, *sedentary with cells parenchyma infusion* (N=12); group 03, *swimming training without cells parenchyma infusion* (N=12) and group 04, *swimming training with cells parenchyma infusion* (N=12). Bone marrow stem cells were obtained and isolated by puncture-aspiration of the bone-marrow. After adaptation in the water, the animals were submitted six times a week to swimming session of 60 min, for six consecutive weeks. The study was double-blind. Statistics Analysis: The comparisons between the groups in relation to difference between the beginning and the end of score were done non-parametric Kruskal-Wallis and post-hoc U Mann-Whitney test and Bonferroni correction ( $p \leq .008$ ), for the identification the significance between groups. It was demonstrated significance:  $p \leq .008$  for swimming training with cells parenchyma infusion group in compared with the others groups, principally in the third moment (difference). The conclusion was that the combination of the bone marrow stem cell therapy (CD45<sup>+</sup>/ CD34<sup>-</sup>) and exercise training resulted in a significant functional improvement in the acute spinal cord injury.

**KEY-WORDS:** spinal cord injury, cell therapy, bone marrow stem cells, exercise training, rat.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1. Célula .....</b>	<b>02</b>
<b>1.2. Célula Nervosa .....</b>	<b>02</b>
1.2.1. Corpo Celular .....	02
1.2.2. Dendritos .....	03
1.2.3. Axônio .....	03
1.2.4. Sinapses .....	05
<b>1.3. Célula Muscular .....</b>	<b>05</b>
1.3.1. Estrutura muscular .....	06
1.3.2. Placa motora .....	06
<b>1.4. Sistema nervoso .....</b>	<b>07</b>
<b>1.5. Medula Espinal .....</b>	<b>08</b>
1.5.1. Estrutura .....	08
1.5.2. Embriologia .....	10
<b>1.6. Coluna Vertebral .....</b>	<b>11</b>

<b>1.7. Transmissão Neuromuscular .....</b>	<b>12</b>
1.7.1. Efeitos da acidose e alcalose metabólica na transmissão neuromuscular .....	13
<b>1.8. Lesão Medular .....</b>	<b>13</b>
1.8.1. Apoptose <i>versus</i> Necrose celular .....	16
1.8.2. Níveis de classificação da lesão .....	17
1.8.3. Choque medular .....	18
<b>1.9. Terapia Celular .....</b>	<b>19</b>
<b>1.10. Exercício Físico .....</b>	<b>22</b>
1.10.1. Lactato .....	23
<b>1.11. Terapia Celular e Exercício Físico .....</b>	<b>24</b>
<b>1.12. Objetivos .....</b>	<b>26</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Animais (Casuística) .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2. Desenho Experimental .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3. Lesão medular .....</b>	<b>29</b>
2.3.1. Posicionamento do animal no INYU .....	30
2.3.2. Funcionamento do INYU .....	31
2.3.3. Parâmetros de Cálculo .....	33
2.3.4. Cuidados pós-operatório do Trauma da Medula espinal Experimental	34
<b>2.4. Obtenção das células da medula óssea: fração mononuclear .....</b>	<b>35</b>
2.4.1. Punção-aspiração da Medula .....	35
2.4.2. Isolamento da fração mononuclear .....	35
2.4.3. Identificação das células mononucleares.....	36

2.4.4.	Quantificação das células .....	36
2.5.	<b>Transplante das células mononucleares .....</b>	<b>36</b>
2.6.	<b>Adaptação ao meio líquido .....</b>	<b>37</b>
2.7.	<b>Treinamento Físico .....</b>	<b>38</b>
2.8.	<b>Análise da concentração do lactato sanguíneo .....</b>	<b>39</b>
2.9.	<b>Escala funcional (BBB) .....</b>	<b>39</b>
2.10.	<b>Procedimentos de Eutanásia e remoção da medula espinal .....</b>	<b>42</b>
2.11.	<b>Preparo e avaliação Histopatológica .....</b>	<b>42</b>
2.12.	<b>Tratamento estatístico .....</b>	<b>44</b>
3.	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
4.	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
6.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>
	<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>SN</b>	Sistema Nervoso
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervoso Periférico
<b>TRM</b>	Trauma Raquimedular
<b>LMET</b>	Lesão Medular Espinal Traumática
<b>L1</b>	Primeira vértebra Lombar
<b>T10</b>	Décima vértebra Torácica
<b>NT-3</b>	Neurotrofina-3
<b>BNDF</b>	Fator Neutrófico Cerebral
<b>INYU</b>	Impactor da Universidade de Nova Iorque
<b>CT-mono</b>	Células Tronco mononucleares
<b>d</b>	Densidade
<b>CD-34</b>	Cluster differentiation 34
<b>CD-45</b>	Cluster differentiation 45
<b>MDMI</b>	Meio Dulbecco Modificado por Iscove
<b>MA</b>	Membro Anterior
<b>MP</b>	Membro Posterior
<b>µL</b>	Micro-litro
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídio (oxidado)
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídio (reduzido)
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>CV</b>	Cresil-violeta
<b>VO<sub>2</sub> máx.</b>	Volume de oxigênio máximo
<b>B.B.B.</b>	Escala funcional Basso, Beatie and Bresnahan

## 1. INTRODUÇÃO

A lesão da medula espinal traumática (LMET) é uma patologia das mais devastadoras entre as lesões que podem afetar o ser humano, constituindo nos dias atuais um verdadeiro desafio da reabilitação para Medicina Regenerativa (SCIVOLETTO, et. al., 2007).

No Brasil, segundos dados do Ministério da Saúde, morrem anualmente 90.000 indivíduos por trauma, a maioria, em acidentes com automóveis. Admite-se que outros indivíduos acidentados serão portadores de invalidez definitiva (paraplegia ou tetraplegia). De acordo com estes dados, morrem 10 brasileiros por hora em acidentes de trânsito (VIALLE, 2000).

Felizmente, com o avanço científico criam-se novas expectativas para melhoria da qualidade de vida dos lesados medulares. Recentemente, a terapia celular é responsável por essas expectativas e notadamente as células-tronco por apresentar capacidade de originar tecidos a partir de sua forma indiferenciada são alvos de pesquisas. Estas células em seus sítios passam do estado quiescente e diferenciando-se em tipos celulares diversos quando necessário; motivando pesquisadores a realizar exaustivas pesquisas experimentais e clínicas na tentativa de efetivar seu uso nas terapias de diversas doenças (BIANCO, et. al., 2001). Não sendo diferente na (LMET), a grande maioria dos esforços atuais, tanto científicos quanto tecnológicos, tem-se concentrado no desenvolvimento e na aplicação de estratégias visando à limitação dos danos após trauma ao Sistema Nervoso Central (SNC) e ampliação do potencial regenerativo dos neurônios lesados (GEBRIN, et. al., 1997).

Uma característica comum dos indivíduos com (LMET) é a mudança radical do estilo de vida. As limitações físicas que a patologia impõe, levando-os ao sedentarismo, agravam ainda mais o quadro clínico. O exercício físico vem gradativamente conquistando espaço como importante agente no âmbito da reabilitação física (MCARDLE, et. al., 2003).

A seguir serão descritas detalhadamente as estruturas celulares e teciduais envolvidas na relação célula nervosa/músculo, os comprometimentos da transmissão neuromuscular com a lesão medular espinal traumática (LMET) e fatores como: terapia celular e exercício físico, que poderão contribuir para minimizar estes comprometimentos.

### **1.1. Célula**

A célula é a unidade básica do organismo, o corpo humano inteiro contém aproximadamente 75 trilhões de células, a maioria das células tem a capacidade de diferenciação e de reprodução. Sempre que um determinado tipo de célula é destruído, por qualquer motivo, as restantes do mesmo tipo, em geral, dividem-se sucessivamente até que o número seja restaurado (JUNQUEIRA, 1990; GUYTON, 2006).

### **1.2. Célula Nervosa**

A unidade estrutural e funcional do sistema nervoso é composta de células nervosas ou neurônios. Segundo ALBERTS (2006) a tarefa fundamental de uma célula nervosa ou neurônio é receber, conduzir e transmitir sinais. Esses elementos são formados por um corpo celular ou pericário de onde partem os prolongamento e seu núcleo (GUYTON, 2006; RASCH, BURKE, 1977).

#### **1.2.1. Corpo celular**

O corpo celular ou pericário representa o centro trófico da célula e sendo capaz de receber estímulos (JUNQUEIRA, 1990). Considerando as proposições de DUUS (1989) este tipo de célula apresenta numerosos prolongamentos, cujo



comprimento variável. Um desses prolongamentos é bem mais comprido que os demais e transmite as descargas das células à periferia, define-se como *axônio* ou *neurito*. Os outros prolongamentos, mais curtos e amplamente ramificados, são definidos como *dentritos*.

### 1.2.2. Dentritos

Prolongamentos numerosos, especializados na função de receber os estímulos do meio ambiente, de células epiteliais sensoriais ou de outros neurônios (JUNQUEIRA, 1990).

### 1.2.3. Axônio

Prolongamento único, especializado na condução de impulsos que transmitem informações do neurônio a outras células (nervosas, musculares, glandulares); sendo a sua porção em geral é muito ramificada (JUNQUEIRA, 1990). O axônio é o centro da fibra de um tronco nervoso, um tronco nervoso contém em média, cerca de duas vezes mais fibras *amielínicas* do que *mielínicas*. O axônio tem no seu conteúdo de *axoplasma*, que é um líquido viscoso intracelular, em torno do qual existe a *bainha de mielina*, que tem a espessura semelhante à do próprio axônio e aproximadamente, a cada milímetro, ao longo da extensão do axônio, a bainha de mielina é interrompida por um *nodo de Ranvier* (GUYTON, 2006). Segundo MELLONI e cols (1994) a bainha de mielina é depositada em torno do axônio pelas células de Schwann. A membrana da célula de Schwann gira em torno do axônio várias vezes, formando múltiplas camadas de membrana celular que contém uma substância lipídica: *esfingomielina*. Essa substância é um excelente isolante que impede quase todo fluxo de íons. Entretanto na junção de duas células de Schwann sucessivas, permanece uma área pequena não isolada, onde os íons podem fluir com facilidade, essa área é o

nodo de Ranvier. Esse processo é denominado por *condução saltatória nas fibras mielinizadas*. Na mesma linha de raciocínio MARTIN (1998), relata que a condução saltatória tem importância por dois motivos: primeiro por fazer que o processo de excitação salte por sobre longos trechos do eixo da fibra nervosa, o que aumenta a velocidade da transmissão nas fibras nervosas mielínicas de cinco a sete vezes, em média; segundo, a condução saltatória conserva energia para o axônio, pois apenas os nodos despolarizam. ALBERTS e cols (2006) afirmam que, quando um potencial de ação alcança as extremidades do axônio (os terminais nervosos), o sinal deve, de alguma forma, ser transmitido às células-alvo com as quais os axônios fazem contato; estes contatos são normalmente neurônios ou células musculares. Tais sinais são transmitidos em junções especializadas denominadas *sinapses*.

Na (FIGURA 1), estão representadas todas as estruturas descritas anteriormente.



**FIGURA 1:** Estrutura neural.  
(Fonte: [www.infoescola.com/imagens](http://www.infoescola.com/imagens))

#### 1.2.4. Sinapses

Na maioria das sinapses, as membranas plasmáticas das células transmissoras e receptoras, são denominadas estruturas pré-sinápticas e pós-sinápticas, respectivamente, separadas por uma fenda sináptica. Para a transmissão elétrica acontecer de um neurônio ao outro, o sinal elétrico do terminal nervoso da célula pré-sináptica é convertido em sinal químico e o sinal químico da célula pós-sináptica converte-se novamente em sinal elétrico, na forma de uma pequena molécula sinalizadora conhecida como neurotransmissor (DUSS, 1989). Os sinais neurais são transmitidos por meio de potenciais de ação. Cada potencial de ação começa com uma variação rápida (abrupta) do potencial de membrana em repouso, que passa de um potencial positivo para um negativo com a mesma velocidade. Para a condução de um sinal neural, tal potencial desloca-se ao longo de uma fibra nervosa até chegar a sua extremidade (GUYTON, 2006; MARTIN, 1998).

#### 1.3. Célula muscular

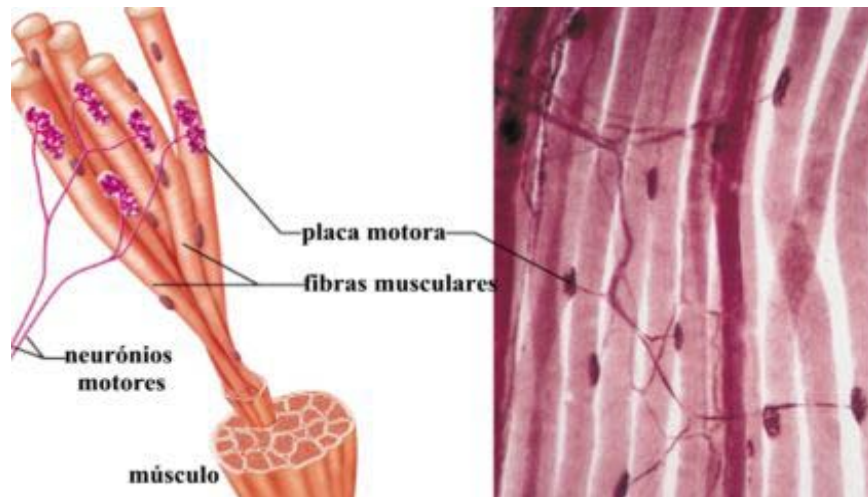
Célula muscular esquelética é um tipo celular altamente característico. Em geral, a célula muscular é extremamente grande, sendo formada pela fusão de muitas células musculares precursoras chamadas de *mioblastos*; tornando a célula multinucleada. As células musculares maduras diferenciam-se das outras células pela produção de proteínas especializadas, como *actina* e *miosina* que fazem parte do potencial contrátil, assim como proteínas receptoras e proteínas de canais iônicos das membranas celulares que tornam as células musculares sensíveis à estimulação nervosa (ALBERTS; et. al., 2006).

### 1.3.1. Estrutura muscular

Estruturas macroscópicas de músculo esquelético contêm milhares de células cilíndricas denominadas *fibras*. Uma fina camada de tecido conjuntivo o *endomísio*, envolve cada fibra muscular e separando-as das demais fibras. O *perimísio*, outra camada de tecido conjuntivo, circunda um feixe de até 150 fibras denominadas *fascículo*. Uma fáscia circunda o músculo inteiro, também formada de tecido conjuntivo, denomina-se *epimísio* (RASCH, BURKE, 1977). Considerando as afirmações de MCARDLE e cols.(2003), a baixo do endomísio e envolvendo cada fibra muscular existe o *sarcolema*. O *sarcolema* é uma membrana fina e elástica que envolve o conteúdo celular de cada fibra. No *sarcolema*, existe uma membrana plasmática (plasmalema) e uma membrana basal, entre as duas membranas existem as células-tronco miogênicas conhecidas como *células satélites*, que são os mioblastos quiescentes, que atuam no crescimento celular regenerativo e em possíveis adaptações com treinamento com o exercício e na recuperação após lesões.

### 1.3.2. Placa motora

A placa motora ou unidade motora é constituída por uma fibra nervosa e as fibras musculares por ela inervadas. As contrações normais das fibras musculares esqueléticas são comandadas por nervos motores. Tais nervos ramificam-se dentro do tecido conjuntivo do perimísio, onde cada nervo origina numerosas terminações. No término das ramificações, o nervo perde sua bainha de mielina e forma uma dilatação que se coloca dentro de uma depressão da superfície da fibra muscular, caracterizando assim uma placa motora ou *junção mioneural* (ALBERTS; et. al., 2006; DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E.; et. al., 2000; GUYTON, 2006). (FIGURA 2)



**FIGURA 2:** Estrutura da placa motora.  
(Fonte: curlygirl.naturlink.pt/tecidos)

#### 1.4. Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso (SN) se caracteriza por receber impulsos sensoriais de receptores e enviar impulsos motores à estruturas somáticas e viscerais, que podem atuar em reflexos dependente ou independentemente do encéfalo (MARTIN, 1998). Segundo CAO e cols. (2002); METZ e cols (2000) o SN divide-se em Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Sistema Nervoso Central (SNC). O SNP subdivide-se em somático e autonômico. O Sistema Nervoso Periférico Somático é estruturado por neurônios sensoriais do feixe dorsal (posterior), sendo os responsáveis pela inervação da pele, músculo esquelético, articulações e pela condução de informações do SNC para a musculatura. O SNP autonômico subdivide-se em sistema simpático e parassimpático. O sistema simpático participa nas respostas do corpo ao estresse e o parassimpático atua no processo de recuperação, para manutenção da homeostase.

O SNC é dividido em quatro principais regiões anatômicas que são: 1) Cérebro (hemisfério, hipotálamo e tálamo); 2) Cerebelo; 3) Tronco encefálico (mesencéfalo, ponte e bulbo) e 4) Medula Espinhal (MARTIN, 1998).

A medula espinal é a parte mais simples do SNC tanto do ponto de vista ontogenético (embriológico) quanto filogenético (evolutivo), sendo que a maioria das conexões encefálicas com o SNP ocorre via medular (DUUS, 1989)

## **1.5. Medula Espinal**

### **1.5.1. Estrutura**

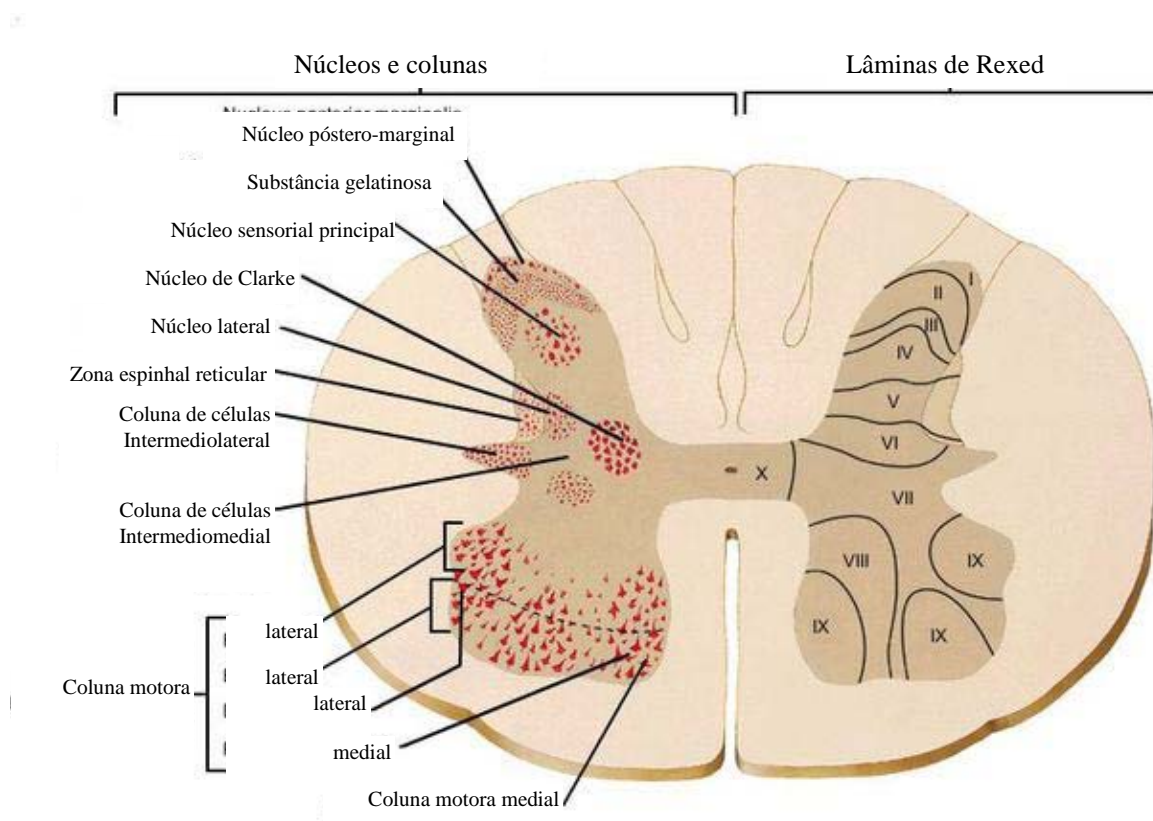
A Medula Espinal é a parte mais caudal do SNC, caracterizada por ser uma massa alongada, cilíndrica, de tecido nervoso situada dentro do canal vertebral. A medula espinal se estende desde da base do crânio até a primeira vértebra lombar (L1), sem ocupá-la completamente e ligeiramente achatada ântero-posterior e a totalidade de seu comprimento se estende até o término da borda caudal da vértebra L1, porém os feixes dorsal e ventral dos nervos lombares e sacrais percorrendo algumas distâncias antes de deixarem a coluna medular, denominando-se *cauda eqüina* (FIELD-FOTE, E.C., 2000). Segundo as considerações de MARTIN (1998) a medula espinal tem calibre não-uniforme, por possuir duas dilatações, as intumescências cervical e lombar, de onde partem maior número de nervos através dos plexos braquial e lombo-sacro, para inervar os membros superiores e inferiores, respectivamente. RASCH, BURKE (1977) afirmam que, seu comprimento médio é de 42 centímetros na mulher adulta e de 45 centímetros no homem adulto. A massa total da Medula Espinal corresponde a apenas 2% do SNC humano, no entanto é responsável pela inervação das áreas motoras e sensoriais de todo o corpo, à exceção das áreas inervadas pelos nervos cranianos. As áreas motoras, localizada no corno ventral direito e esquerdo da substância cinzenta, possuem neurônios motores e as áreas sensitivas, localizadas no corno dorsal direito e esquerdo também na substância cinzenta, possuem neurônios sensitivos.

Na substância cinzenta, a organização neuronal é delineada por duas definições: a primeira é definida por *colunas e núcleos*, sendo o corno dorsal um dos locais para o término das fibras sensórias primárias. Há três núcleos em todos os níveis de medula espinhal: o *núcleo póstero-marginal*, a *substância gelatinosa* e o *núcleo sensorial principal*. Em segmento mais específico ao nível de C8 e L3, há o *núcleo de Clarke* (núcleo dorsal ou torácico), já no corno ventral, existe a *coluna motora medial* que se estende ao longo de toda a medula e inerva a musculatura axial. Por fim, presentes nas intumescências cervicais (C5 a T1) e lombossacra (L1 a S3), há as *colunas motoras laterais* responsáveis pela inervação dos músculos dos membros respectivos, na coluna de células também denominadas *intermediolateral* contendo neurônios simpáticos pré-ganglionais, que estão associados aos reflexos motores viscerais (MAIERON, et. al. 2007).

A segunda definição, denominada por *Lâminas de Rexed*, é de um mapa citoarquitetônico da substância cinzenta contendo dez lâminas, que se correlaciona com as conexões sinápticas e com os dados eletrofisiológicos (BANNATYNE, et. al. 2006).

As lâminas **I**, **II**, **III** e **IV** de Rexed formam a maior porção do corno dorsal. A lâmina **I** corresponde ao *núcleo póstero-marginal*, via responsável pelo processamento dos sinais de dor aguda-fina “rápida” e a **II** à substância gelatinosa, via responsável pelo processamento dos sinais de dor crônica “lenta”. A lâmina **III** também responsável pela dor “lenta” e a lâmina **IV** incluem a maior parte dos *núcleos sensoriais principais*. A **V** também responsável pela dor “rápida” e a **VI** ocupam a base do corno dorsal, sendo subdivididas em porção medial e lateral, estas duas lâminas são essenciais para a integração da informação motora somática, por serem os locais onde normalmente terminam as fibras primárias, são as principais origens das fibras espinocerebelares. As lâminas **VII** e **VIII** incluem o *núcleo dorsal de Clarke* e as colunas de células *intermediolateral* e *intermediomedial*, estas lâminas se estendem por toda a zona intermédia e as porções ventrais da substância cinzenta. A **IX** inclui as colunas *motora lateral* e *medial* para finalizar, a lâmina **X**, corresponde a substância cinzenta central da medula (OZ, et. al. 2005; GUYTON, 2006).

As definições da organização neuronal de substância cinzenta, estão representadas pela (FIGURA 3).



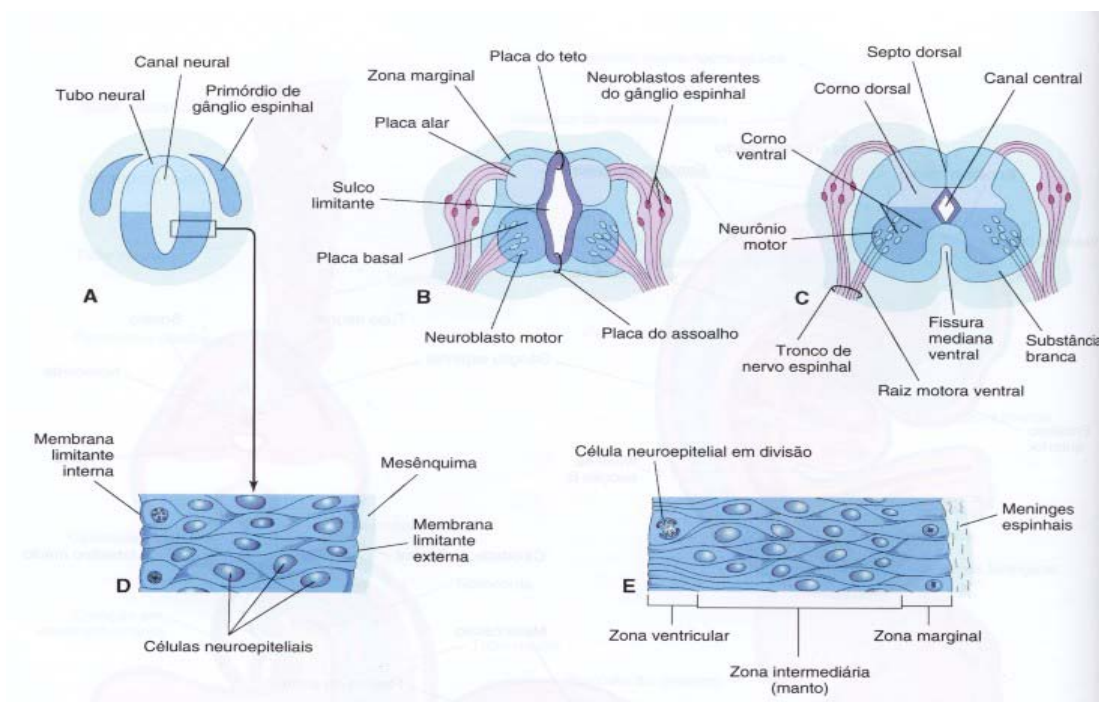
**FIGURA 3:** Organização neuronal da substância cinzenta.  
(Fonte: homepage.mac.com)

### 1.5.2. Embriologia

ALBERTS et. al. (2006); KURITA, N. et. al. (2005) e TESSLER, A. et al. (1997) analisaram que, aproximadamente na terceira semana do desenvolvimento pré-natal, o ectoderma do disco embrionário, o folheto que está em contato com o meio externo e que tem como função originar o sistema nervoso, situado acima da notocorda, se espessa formando a placa neural. Segundo GUYTON (2006) para a formação desta placa e desenvolvimento do tubo neural há um importante papel da ação indutora da notocorda e do mesoderma. A substância cinzenta da medula



origina-se, portanto, da zona intermediária do neuroepitélio, já a substância branca tem origem da zona mais externa, marginal. Uma camada de revestimento de células ectodérmicas envolta da medula primitiva forma as meninges internas: aracnóide e pia-máter. Já o revestimento externo mais espesso, a dura-máter, é formado pelo mesênquima (FIGURA 4).



**FIGURA 4:** desenvolvimento da medula espinal.  
(Fonte: [www.forp.usp.br/mef/embriologia](http://www.forp.usp.br/mef/embriologia))

## 1.6. Coluna Vertebral

A coluna vertebral consiste de 33 vértebras, 24 das quais formam a coluna flexível, onde 07 vértebras são cervicais; 12 são torácicas; 05 são lombares; 05 estão fundidas formando o sacro, a porção posterior da pelve e as 04 mais inferiores que estão parcialmente desenvolvidas constituindo o cóccix. (RASCH, BURKE, 1977)

Cada vértebra apresenta pontos anatômicos característicos, o *corpo vertebral*. O corpo vertebral é a maior e a mais importante porção vertebral, pois esta

estrutura tem a função de sustentar e suportar o peso das demais estruturas acima dele. Posteriormente, estão os dois *pedículos* e as duas *lâminas*, no interior destas estruturas se localiza o *forame vertebral*, por onde passa a medula espinal. Um *processo espinhoso* se estende posteriormente e dois *processos transversos* um de cada lado, há quatro *processos articulares*, dois acima e dois abaixo, estes processos articulam-se com as vértebras adjacentes. Debaixo de cada pedículo, está a *incisura intervertebral*, por onde saem os nervos que deixam a medula espinhal (DEFINO, 1999).

### 1.7. Transmissão Neuromuscular

Segundo MARTIN (1998) para ocorrer transmissão por meio da sinapse, são necessários três elementos distintos: primeiro: o *terminal pré-sináptico*, que é o terminal axônico do neurônio; segundo: a *fenda sináptica*, que é o espaço entre as terminações nervosas e a membrana da fibra muscular e terceiro: a *membrana receptora*, presentes na membrana muscular. No terminal axônico, há muitas mitocôndrias que fornecem energia, principalmente para a síntese do transmissor excitatório: a *acetilcolina*, que por sua vez, excita a fibra muscular. Considerando as afirmações ALBERTS (2006); MARTIN (1998) e JUNQUEIRA (1990) a acetilcolina é um mediador químico de pequeno peso molecular, junto com o Glutamato, atuando como neurotransmissores excitatórios. A transmissão do impulso ocorre através dos canais de iônicos que permitem a passagem de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual despolariza a membrana plasmática rumo ao potencial limiar necessário para desencadear um potencial de ação.

Segundo ELBASIOUNY (2007); SHIELDS (2007) e GUYTON (2006) um transmissor ou neurotransmissor pode desencadear excitação ou inibição, isso é determinado não somente pela natureza do transmissor, mas também pela natureza do receptor na membrana pós-sináptica. Em outras palavras, um neurônio pode ser excitado por uma sinapse que libera o mediador químico *acetilcolina*, mas o mesmo neurônio pode ser inibido por outra sinapse, que libera

outro mediador químico a *glicina*. Portanto a membrana neuronal contém um receptor *excitatório* para acetilcolina e um receptor *inibitório* para glicina.

#### 1.7.1. Efeitos da acidose e alcalose metabólica na transmissão neuromuscular

Os neurônios são altamente sensíveis às alterações de pH do líquido intersticial, fluido no qual são imersos. A alcalose aumenta consideravelmente a excitabilidade neuronal. Um aumento no pH do valor normal de 7,4 até aproximadamente 7,8 pode produzir convulsões devido ao aumento da excitabilidade neuronal.

Entretanto, a acidose diminui consideravelmente a atividade neuronal. Uma diminuição do pH de 7,4 para cerca de 7,0 pode desencadear um estado comatoso (coma) (TERADA, 2001; REYNOLDS, 2000).

### 1.8. Lesão Medular

A lesão medula espinal traumática (LMET) é uma lesão grave que pode afetar o ser humano. A LMET remonta à própria história da medicina: as mais antigas descrições encontram-se em papiros descobertos por Edwin Smith, em 1862 na cidade de Tebas, mas como sendo cópia de um manuscrito original escrito talvez entre 3000 e 2500 a.C. Estes papiros relacionam seis casos de lesão vertebral e reconhecem a paralisia provocada por estas graves lesões, com recomendações para o seu tratamento ([www.spinalcord.org](http://www.spinalcord.org), 2008).

Embora de forma lenta, o século passado foi marcado por maior enfrentamento da LMET, primeiro para tentar melhor compreendê-la e depois para combater suas seqüelas.

A LMET atinge principalmente a faixa etária mais exposta aos acidentes, que em geral é também a mais produtiva. Cerca de 60% dos casos de LMET ocorrem em pessoas entre 16 e 30 anos de idade, mas a média está aumentando com o aumento da longevidade do ser humano, chegando aos 38 anos nesta última década (BIRMINGHAM, A.L.; et. al., 2003).

Devido às peculiaridades econômicas brasileiras, é difícil obter dados estatísticos precisos a respeito da LMET, sendo as estimativas baseadas nas informações provenientes dos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, desde 1937, existe o National Spinal Cord Injury Database que, registra informações oriundas de 21 centros federais de atendimento à pacientes com lesão medular. Através de seus dados, estima-se que, a incidência anual de LMET está entre 30 a 40 casos novos por milhão de habitantes. Estudos realizados em 2004 pelo Centro de estatística Nacional de lesão medular americano (*National Spinal cord Injury Statistical Center*), mostraram que há uma incidência de 11.000 casos anuais com uma prevalência de 247.000 casos nos Estados Unidos. Desta incidência são constatados que 78% são homens. Dentre as causas, 50%, estão relacionados aos acidentes; 23,8%, relacionados às quedas e 11,2%, relacionados às violências. Este último dado refere-se principalmente às violências com armas de fogo. Este estudo fez um levantamento dos gastos federais com esta incidência chegando ao valor de 682 mil e 957 dólares no primeiro ano; e durante 25 anos de acompanhamento de 11.000 casos, houve um gasto total de 2 milhões 693 mil e 887 dólares (www.asia-spinalinjury.org, 2008; STRAUSS, et. al., 2008).

Fora do Brasil, os homens representam 82% dos lesados, fruto da sua exposição aos fatores de risco, tais como dirigir em excesso de velocidade ou dirigir alcoolizado ou por agressões. No mundo todo, a causa principal de LMET é acidente de trânsito; dos casos relatados nos Estados Unidos, 50,4% têm esta etiologia. A terceira causa que mais contribui para provocar LMET é a violência, sob várias formas, incluindo ferimento por projétil de arma de fogo. Esta forma de agressão, em especial, tem aumentado assustadoramente a sua participação nas estatísticas dos últimos anos (BIRMINGHAM, A.L.; et. al., 2003).

No Brasil dados levantados pela Rede de Hospital de Reabilitação Sarah, em um período de fevereiro de 1999 até janeiro de 2000, mostraram características semelhantes aos dados estrangeiros, por serem em sua maioria, jovens e adultos jovens, homens (71,7%), solteiros (54,0%), com escolaridade até o ensino fundamental (49,3%) e de residentes em áreas urbanas (91,8%) (www.sarah.br, 2008).

Em Curitiba, dados obtidos pelo Grupo Integrado de Apoio ao Paraplégico – GIAPA – Hospital Universitário Cajuru, mostram que em 240 casos onde foi possível determinar a causa de LMET: 42% foram vítimas de acidente de trânsito e 27% de violência que, incluem variadas formas de agressão (VIALLE, E; et. al., 2002).

A participação de várias especialidades médicas envolvidas e a mobilização de pacientes e familiares em associações propiciou o diagnóstico precoce da LMET assim como, o desenvolvimento de técnicas de tratamento e prevenção das complicações e de sua padronização internacional.

A LMET sendo considerada como fato irreversível até há pouco tempo; atualmente existem perspectivas da regeneração da lesão medular e recuperação funcional com mais otimismo (TESSLER, A.; et. al., 1997).

É universal a aceitação de dois mecanismos fisiopatológicos da lesão neurológica: o primeiro produzido pelo trauma em si, como morte celular e liberação de eletrólitos, metabólitos e enzimas; este é um processo mecânico que, independe do controle celular. O segundo, surge como uma cascata de fenômenos, envolvendo edema, inflamação, isquemia, re-perfusão, fatores de crescimento, metabolismo do cálcio e peroxidase lipídica. Estes dois mecanismos interferem na regeneração celular, culminando em agressões de neurônios e de seus axônios.

O tratamento atual segue estes dois mecanismos fisiopatológicos: prevenção da lesão progressiva após o trauma e restauração de neurônios danificados. (ANDERSON, D.K.; et. al., 1988).

Estudos multicêntricos demonstram o efeito protetor dos corticóides, particularmente da metilprednisolona, quando utilizada nas primeiras 8 horas após

o trauma, demonstrando que o dano medular é progressivo e podendo ser reduzido com tratamento adequado. No campo de regeneração, com a aplicação de técnicas em biologia molecular, a qual identifica e sintetiza proteínas com atividade de fator de crescimento neuronal são aplicadas com sucesso em etapa experimental pré-clínica. (BRAUGHLER; HALL, 1983; CONSTANTINI; YOUNG, 1994).

#### 1.8.1. Apoptose *versus* Necrose celular

As células de um organismo multicelular são altamente organizadas e fortemente reguladas, não apenas pela função da divisão celular, mas também pelo controle da morte celular (MCARDLE, et. al., 2003). Na mesma linha de pensamento ALBERTS (2006) relata que, se as células não tem mais uma funcionalidade, estas células cometem suicídio, por meio de um programa de morte intracelular. Esse processo é chamado de *morte celular programada* ou comumente conhecido por *apoptose*.

No desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados, mais da metade das células nervosas produzidas morrem logo após a sua formação, em um adulto saudável, bilhões de células morrem na medula óssea a cada hora, porém há um equilíbrio exato entre morte celular e divisão celular. (DUUS, 1989).

Segundo ALBERTS (2006) e JUNQUEIRA (1990) afirmam que, morte celular, como resultado de uma doença aguda, normalmente é um processo gradativo, onde as células incham, arrebentam, derramando todo seu conteúdo sobre o meio extracelular, um processo denominado *Necrose Celular*. Esse mecanismo aciona uma resposta inflamatória potencialmente danosa. Em contrapartida, uma célula que sofre apoptose morre de forma programada, sem danificar o ambiente extracelular.

GUYTON (2006) descreve o processo de uma morte programada. A célula em apoptose se enrugam e condensa, o citoesqueleto se colapsa, o envelope nuclear se desmonta e o DNA do núcleo se quebra em fragmentos. A superfície

da célula é alterada para que atraia células fagocitárias, geralmente células fagocitárias especializadas, denominadas: Macrófagos. Os macrófagos fagocitam as células em apoptose antes do extravasamento do conteúdo intracelular. Essa remoção rápida da célula morrendo evita as consequências danosas da *necrose celular*.

### 1.8.2. Níveis de classificação da lesão

Os níveis de lesão medular podem ser divididos em dois grupos principais: Paraplegia e Tetraplegia.

#### 1. Paraplegia

Define-se por paralisia parcial ou completa do tronco, ou parte dele e ambos os membros inferiores, podendo ser resultante de lesão da medula espinal torácica ou lombar, incluindo raízes sacrais; compreendendo os intervalos: T1-T12, L1-L5 e Sc1-Sc5 (FIGURA 5).

A paraplegia pode se subdividir em outros dois níveis:

Paraplegia alta: lesão dos segmentos em um intervalo de T1 até T6.

Paraplegia baixa: lesão dos segmentos em um intervalo de T7 até T12.

#### 2. Tetraplegia

Define-se pela paralisia parcial ou completa dos quatro membros e tronco, incluído musculatura responsável pelo sistema respiratório e órgãos pélvicos. Sendo resultante da lesão medular cervical. Atendendo os intervalos de C1 até C7 (FIGURA 5).

A tetraplegia pode se subdividir em outros dois níveis:

Tetraplegia alta: lesão dos segmentos em um intervalo de C1 até C5.

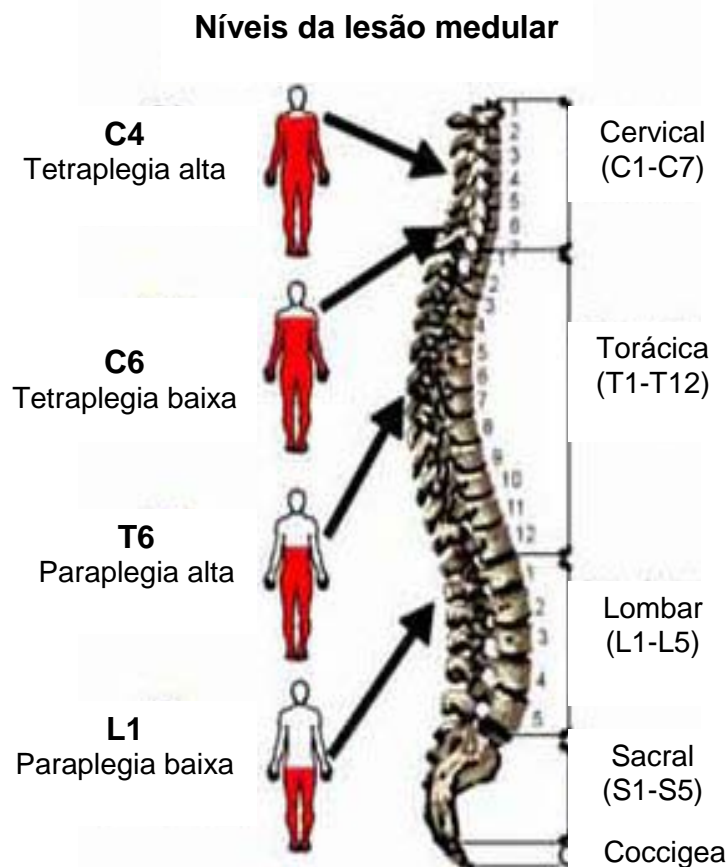
Tetraplegia baixa: lesão dos segmentos em um intervalo de C6 até C7.

### 1.8.3. Choque medular

No momento em que a medula espinal sofre um trauma repentino, praticamente todas as funções medulares, ficam deprimidas até o ponto de inexistência. Tal reação é conhecida como *Choque medular*. Porém, depois de algumas horas, alguns dias ou semanas de choque medular, os neurônios medulares podem gradativamente readquirir sua excitabilidade. Essa parece ser uma característica natural dos neurônios em todo sistema nervoso. Significa que, depois de perderem sua estimulação de impulsos facilitadores, as células nervosas aumentam o seu próprio grau de excitabilidade para compensar a perda (KURITA, et. al., 2005).

Segundo SCIVOLETTO et. al. (2007) em muitos não-primatas, a excitabilidade dos centros medulares retorna ao estado normal em algumas horas a um dia. Nos seres humanos o retorno é geralmente mais demorado devido sua complexidade, várias semanas e alguns casos nunca é completo.





**FIGURA 5:** Classificação da lesão medular.  
(Fonte: [www.kenyanparaplegic.org](http://www.kenyanparaplegic.org))

### 1.9. Terapia Celular

O processo inflamatório agudo após o trauma da medula espinal persiste em até 48 horas e são os responsáveis por lesões secundárias e às vezes mais graves do que a própria lesão direta do trauma, sendo a terapia celular nesta fase uma possibilidade de ação antiinflamatória direta e possibilidade de otimizar a integração de células pluripotentes na reparação da lesão, antes do aparecimento das cavitações parenquimatosas, resultado da degeneração neuronal (CONSTATINI, S.; YOUNG, W., 1994; MANSILIA, A.; et. al., 2006).

As células-tronco adultas são pluripotentes e encontradas em vários sítios do organismo. O sítio mais freqüente é o sangue da medula óssea, e dentre este a

medula óssea da crista ilíaca é a região preferencial, devido ao fácil acesso e maior volume de sangue. No sangue da medula óssea existem vários componentes: o sangue periférico e as células mononucleares. As células mononucleares se dividem em duas linhagens: linhagens hematopoiética (1-2%) e mesenquimal (0,001- 0,01%) (STRAUER B.E., KORNOWSKI R., 2003).

A linhagem hematopoiética apresenta: as células progenitoras hematopoiéticas e as células progenitoras endoteliais. A linhagem mesenquimal: apresenta as células-tronco mesenquimais. As células-tronco mesenquimais, também chamadas de estromais, apresentam potencial de diferenciação em diversos tecidos de origem do mesênquima como: ossos, cartilagem, adipócitos, tendões e músculos. (KIRSCHSTEIN R., 2001)

Além de todos os resultados experimentais e humanos já demonstrados, as células-tronco adultas da medula óssea apresentam as seguintes vantagens; fácil obtenção, origem autóloga, fácil expansão *in vitro*, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens e sensibilidade elevada a moléculas sinalizadoras específicas. (THOMPSON R.B. et. al., 2003)

As células precursoras adultas também compartilham no mínimo duas características: a auto-renovação e a possibilidade de originar vários tipos celulares maduros com características morfológicas e funções especializadas. Células precursoras adultas são raras. Sua função primária é manter o estado funcional da célula e, com certas limitações, repor células destruídas por lesão ou doença. Além disso, estão dispersas em tecidos maduros internos, atuando de formas diversas, dependendo de seu local de desenvolvimento (HOFSTETTER et. al., 2002; HERMANN et. al., 2004).

Uma célula precursora adulta deve ser capaz de originar células diferenciadas que possuam fenótipos maduros e inteiramente integrados, sendo capazes de executar funções especializadas próprias do tecido. O termo fenótipo se refere às todas características essenciais: morfologia, interações com outras células e ambientes não celulares, proteínas presentes na superfície celular e comportamento celular (secreção, contração, transmissão sináptica). Esta capacidade, somada ao conceito da plasticidade, ou seja, a habilidade de

diferenciar-se em tipos celulares de fenótipos não relacionados às células em seu tecido de origem, torna-as candidatas viáveis, para o reparo de um tecido lesionado.

Descobertas recentes têm demonstrado o potencial clínico destas células, inclusive no cérebro e medula espinal, e acredita-se no seu potencial regenerativo. Das células precursoras adultas, tanto as progenitoras hematopoéticas quanto mesenquimais são capazes de promover regeneração quando liberadas na circulação. (HOFSTETTER et. al., 2002; PITTINGER M. et. al., 2002; HERMANN et. al., 2004).

Baseados no princípio que, as células-tronco mesenquimais são pluripotentes, tendo em sua fração celular, precursores de células mesenquimais, estas seriam capazes de se diferenciar de acordo com o meio *in vitro*, e espera-se que as células transplantadas por interação celular tecidual *in vivo*, sejam capazes de diferenciarem em células do tecido o qual foi transplantada e regenerar o tecido, inclusive funcionalmente. (VERFAILLIE, 2002).

Já as células-tronco embrionárias, são aquelas isoladas até o quinto dia de fecundação (blastocisto) que, possuem a capacidade de diferenciar-se em qualquer tipo de tecido do organismo (totipotente), incluindo os tecidos germinativos e placentários. Após este período, essas células reduzem a sua capacidade de replicação, mas mantêm a sua plasticidade. Quanto mais precoces são as células, maior o potencial proliferativo e de adaptação ao tecido transplantado (BIANCO P., et. al., 2001). No entanto, as pesquisas com essas células em nosso país são objeto de polêmica e controvérsias jurídicas e religiosas; não havendo até o momento liberação para o seu uso em pesquisa quando se trata de células-tronco embrionárias humanas.

Da escolha do animal Experimental: a maior parte das pesquisas que, apresentou resultados aplicáveis ao ser humano, desenvolveu-se em pequenos animais e os principais estudos analisaram os fenômenos decorrentes da produção nestes animais de uma lesão traumática padronizada. Desta maneira, os tratamentos propostos são testados, supostamente, sobre portadores de lesões idênticas, o que torna mais confiável o resultado obtido. De acordo com os

pesquisadores envolvidos neste tipo de pesquisa admitem que, o melhor animal para estas experiências é o rato; sendo a única forma de comparar resultados é a partir de lesões padronizadas e em grande volume de espécimes. (NOBLE; WRATHALL, 1985; WRATHALL; PETEGREW; HARVEY, 1985; ENGESSER-CESAR et. al., 2005).

### **1.10. Exercício Físico**

Exercícios físicos sistematicamente realizados resultam em grande parte mudanças no organismo. As mudanças têm o seu lugar ao nível das estruturas celulares, dos tecidos, dos órgãos e do corpo como um todo. As mudanças estendem-se desde os processos metabólicos celulares com seus mecanismos moleculares até a capacidade funcional das estruturas celulares dos órgãos e de seus sistemas. Alterações pronunciadas têm sido encontradas em relação aos mecanismos de controle das funções corporais e dos processos metabólicos, incluindo os níveis de auto-regulação celular, hormonal e neural (KIRKENDALL D.T.; et al., 2003).

O treinamento físico induz adaptação significativa em uma ampla variedade de capacidades funcionais relacionadas ao transporte e à utilização do oxigênio, produz melhoras significativas na capacidade para o controle respiratório no músculo esquelético. O músculo esquelético treinado contém mitocôndrias maiores e mais numerosas, além do aumento da atividade das enzimas oxidativas. A atividade aumentada das enzimas  $\beta$ -oxidação e um melhoramento generalizado do potencial oxidativo das fibras musculares tornam possível a maior utilização dos lipídeos. (MCARDLE, et. al., 2003; NAKAO, 2000). Segundo FOSS e cols (2000) estudo realizado no sarcolema por meio de biópsia demonstrou que pessoas exercitadas tiveram suas quantidades de bombas de Na-K aumentadas no músculo em comparação com indivíduos não treinados. KIRKENDALL e cols (2003) afirmaram que no retículo sarcoplasmático (SR) em ratos treinados com natação, identificou-se um aumento do conteúdo protéico no músculo. O SR

promove o sequestro de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o mecanismo contrátil, reincorporando esses íons após a contração. A mioglobina tem a propriedade de aumentar a concentração no músculo esquelético no exercício de resistência em ratos, contribuindo para o aumento da taxa de difusão de  $\text{O}_2$  no músculo, do citoplasma para a mitocôndria. O treinamento de resistência estimula o processo eritropoiético na medula óssea, resultando no aumento dos números de hemoglobinas.

A adaptação neural e os efeitos do treinamento estão relacionados à formação de novos mecanismos nos diversos níveis do Sistema Nervoso Central (SNC). Essas adaptações neurais estão relacionadas, em parte, com a síntese protéica adaptativa no tecido nervoso. Em ratos exercitados, a síntese protéica encontra-se intensificada nos neurônios, incluindo a síntese de proteínas mitocondriais, também está relacionadas com mudanças nas junções neuromusculares, caracterizada pelo aumento da área terminal do nervo pré-sináptico e da densidade de vesículas de acetilcolina e de receptores sinápticos (KIRKENDALL D.T., et. al., 2003; AAGAARD, P., et. al., 2002).

Recentemente, treinamentos físicos e locomotores após lesão medular espinal traumática (LMET) em modelos animais, tem mostrado significantes melhoras na avaliação locomotora, através da escala Basso, Beattie and Bresnahan (BBB). (ENGESSER-CESAR, C; et. al., 2005)

#### 1.10.1. Lactato

A prática do exercício físico induz diversas adaptações bioquímicas, principalmente no sistema muscular. O exercício aeróbio estimula alterações que beneficiam a aerobiose, aumentando tanto o número quanto o tamanho das mitocôndrias (OLIVEIRA, C.A.M.; ROGATTO, G.P.; LUCIANO, E., 2002). Com o aumento do número e do tamanho das mitocôndrias, há uma melhor eficiência da captação dos elétrons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) sendo arrancados do substrato da Glicólise aeróbia e carregados pelo (*nicotinamida adenina dinucleotídio*) NADH (reduzido), que é uma coenzima  $\text{NAD}^+$ (oxidado), transportando átomos de hidrogênio. O

hidrogênio é oxidado aproximadamente no mesmo ritmo com que é disponibilizado (MCARDLE, W. D.; et al., 2003).

Quando este ritmo estável não acontece, ou seja, as demandas energéticas ultrapassam tanto o suprimento de oxigênio quanto seu ritmo de utilização, a cadeia respiratória não consegue processar a demanda de hidrogênio ligado ao NADH. Por tanto á medida que os íons  $H^+$  não-oxidados “em excesso” se combinam temporariamente aos pares com o piruvato formam *Lactato*, caracterizando o sistema chamado Glicólise anaeróbia (GOBATTO, C.A. et al., 2001; FOSS et. al., 2000; GUYTON, 2006).

Porém, estudos demonstraram que mesmo com exercícios utilizando cargas moderadas (50 – 75% do  $VO_2$  máx.), isso significa concentração intracelular adequada de oxigênio, ocorre acúmulo de lactato tanto muscular quanto sangüíneo (BROOKS, 1985; CAMPBELL et. al., 1989). Com isso PINNINTON e DAWSON (2001), afirmam que a análise do lactato sangüínea é comumente usada por cientistas do esporte para adquirir informações sobre as respostas metabólicas em várias intensidades de exercícios.

### **1.11. Terapia Celular e Exercício Físico**

Um dos interesses atuais na biologia molecular enfoca a maneira pela qual a atividade física pode em curto prazo e crônica, atuar e interagir de forma a induzir adaptações estruturais e funcionais que, aprimoram e produzem resultados de saúde desejáveis.

Estudos multicêntricos vêm demonstrando em modelos animais, resultados promissores no trabalho combinado da terapia celular e exercícios físicos para melhoria das condições clínicas da lesão medular espinal. DUPONT - VERSTEEGDEN e cols (2000) demonstrou em ratos com lesão medular, que há um melhor resultado na terapia celular combinado com exercícios físicos em relação à restauração de zonas musculares, analisando números de miofibrilas musculares e células satélites ativas.

Durante os últimos 25 anos, o exercício obteve aceitação generalizada como parte integral dos programas de reabilitação assistencial e de manutenção de saúde para uma lista cada vez maior de doenças crônicas e de condições de incapacidade (MCARDLE W. D.; et al., 2003).

Baseado nos benefícios do exercício físico BASSO e cols (2004) demonstraram em ratos com lesão medular espinal parcial ao nível da oitava vértebra torácica (T8), que o exercício aumenta os fatores de crescimento neural, fatores neurotróficos: neurotrofina-3 (NT-3) e o fator neurotrófico cerebral (BDNF). Esses fatores são moléculas protéicas capazes de induzir o crescimento das células neurais, sendo encontrados nos neurônios motores e sensoriais e na musculatura estriada esquelética, sendo importante para contribuição da Sinapse I para a Sinapse plástica através da modulação dos neurotransmissores. (BACKELANDT et. al., 1994; MELLONI et. al., 1994; WANG et. al., 1995).

Estudos realizados por HAWKE (2005) e CREWS (2004) mostram que o exercício físico aumenta a produção dos fatores de crescimento neural que por sua vez estimula a neurogênese.

Com essas afirmações, a hipótese deste estudo é que a terapia celular auxiliada pelos exercícios físicos poderá apresentar resultados promissores na regeneração neuronal no Trauma da Medula Espinal.

## 1.12. Objetivos

### 1. Objetivo geral

- Analisar os efeitos do treinamento físico *versus* sedentarismo no resultado da terapia intratecal de células-tronco derivadas da medula óssea adulta; fração mononuclear adulta no trauma da medula espinal fase aguda.

### 2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos funcionais por meio da Escala Funcional Basso, Beatie and Bresnahan (B.B.B.).
- Verificar os efeitos da associação do treinamento físico e terapia celular com o auxílio das análises de concentração de lactato sangüíneo.
- Correlacionar os achados dos efeitos funcionais com os histopatológicos.



## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **2.1. Animais (Casuística)**

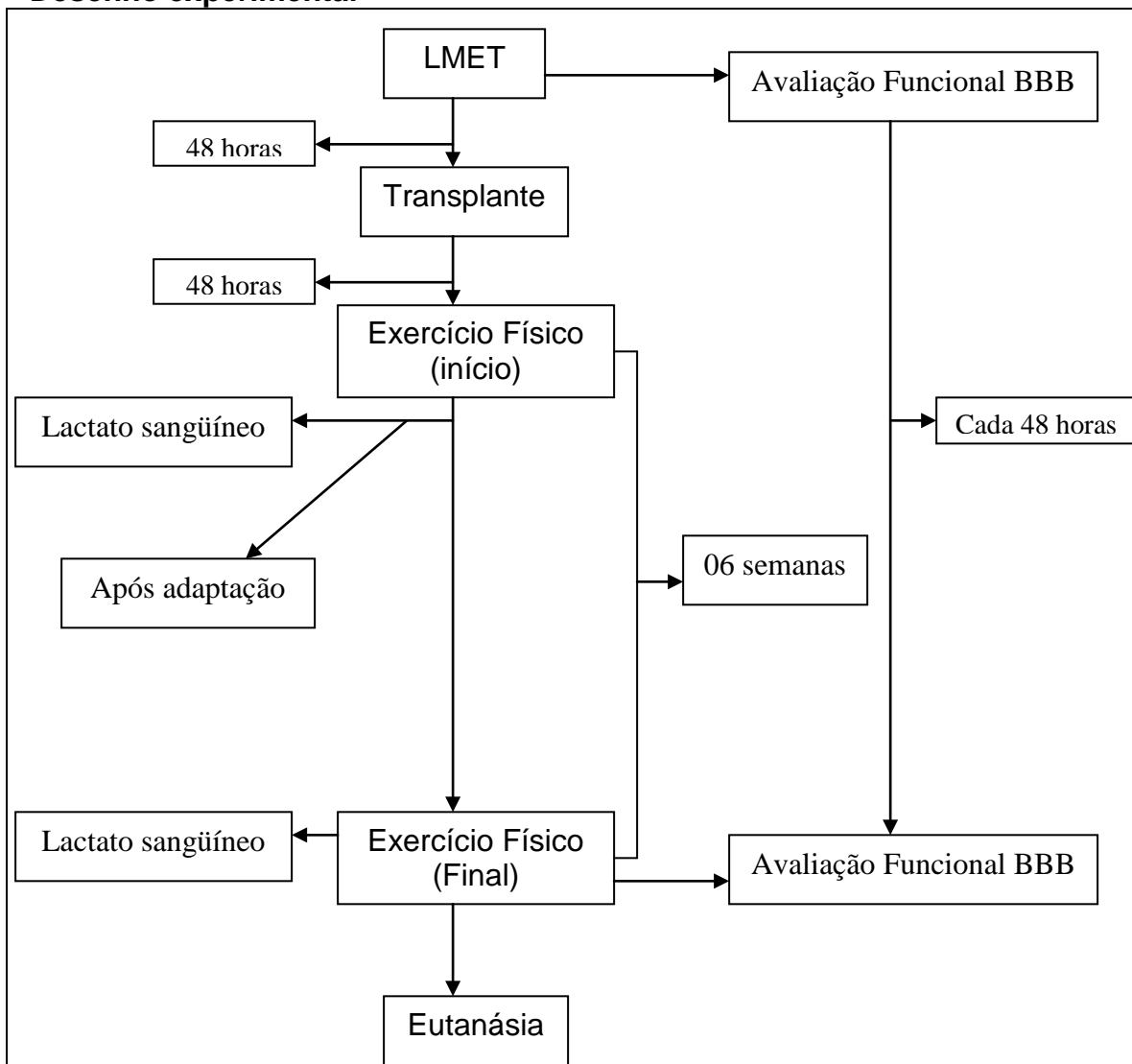
Todos os protocolos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (processo: 23075.047723/2007-89). Foram utilizados 70 ratos machos adultos da linhagem Wistar de 90 dias de idade, com peso médio 250 gramas ( $\pm$  50g.), com ciclo circadiano invertido (claro/escuro) de 12 horas, (7h00 – 19h00), a temperatura média do Biotério era de 24°C. ( $\pm$  1°), alimentação e água *ad libitum*. Seis experimentos foram realizados com duração de sete semanas: lesão medular espinal traumática, transplante das células derivadas da medula óssea (fração mononuclear) e seis semanas de treinamento físico.

### **2.2. Design Experimental**

Dos 70 animais utilizados para o estudo, onde 48 terminaram o período de 48 dias da pesquisa, 18 foram excluídos por complicações como: infecções generalizadas, obstrução das vias urinárias e autofagia. E mais quatro animais foram excluídos devido à avaliação funcional 48 horas após a LMET ficar acima do escore 08 (ver item 2.9.), totalizando 22 animais na perda da amostra. Os 48 animais que passaram pela LMET; dois dias depois passaram pelo transplante das células mononucleares derivadas da medula óssea, onde a metade (24 animais) recebeu realmente células e o restante (24 animais) recebeu apenas injeção de meio de cultura (placebo). Dois dias após o transplante celular os animais foram selecionados randomicamente para o exercício físico. Formando quatro grupos de estudo (TABELA 1).

**Grupos experimentais**

<b>Divisão</b>	<b>n</b>
Sedentário com Meio ( <b>Sm</b> )	12
Sedentário com células-tronco ( <b>Sct</b> )	12
Treinado com meio ( <b>Tm</b> )	12
Treinado com células-tronco ( <b>Tct</b> )	12
<b>Perda de amostra</b>	22

**TABELA 1:** Divisão dos Grupos.**Desenho experimental****FIGURA 6:** Organograma do Design Experimental.

A seguir serão descritos detalhadamente todos os procedimentos demonstrados no Design Experimental.

### **2.3. Lesão medular**

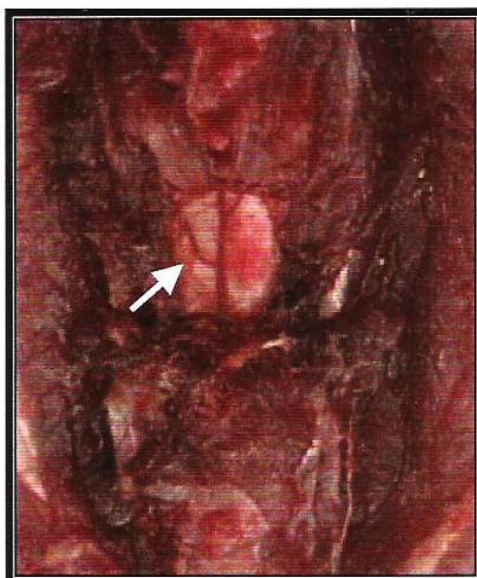
Para a lesão da medula espinal, os animais foram anestesiados com Xilasina e Ketamina intraperitoneal (10 mg/kg e 50 mg/Kg respectivamente). Uma vez confirmada o efeito da anestesia, por meio da ausência de resposta motora do animal, foram seguidos os procedimentos de acordo com as normas do MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) (VIALLE, 1999; VIALLE, 2001; YOUNG, 2002).

Os animais foram submetidos à tricotomia e anti-sepsia com solução de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI - Presist®). Procedeu-se, então, à incisão de aproximadamente 5cm de pele e subcutâneo sob a linha média da região dorsal, tendo como referência os processos espinhosos da oitava à décima terceira vértebra torácica (foi válido o conhecimento de que ratos da linhagem Wistar possuem 13 vértebras torácicas), a seguir procedeu-se o afastamento subperiosteal da musculatura paravertebral. Após essa exposição, a laminectomia foi realizada ao nível da nona e da décima vértebra torácica (T9 e T10), tais vértebras identificadas por contagem dos arcos costais, e os elementos como: processos espinhosos; processos articulares e as lâminas vertebrais foram removidos sem lesão do saco dural, com o uso de um minisacabocado (KING, et. al. 2006; VIALLE, 2002).

Segundo VIALLE, (2005) a exposição da medula deve ser ampla o suficiente para permitir que a lesão medular ocorra pelo contato direto da haste impactora com o tecido nervoso, pois o contato com tecido ósseo reduzirá a intensidade do impacto e conseqüentemente inviabilizará a inclusão do animal do estudo, como mostra a FIGURA 7.

A lesão medular espinal foi provocada por impacção, através da queda de uma haste de 10g de peso com 25mm de altura em uma área seccional de 2mm<sup>2</sup>,

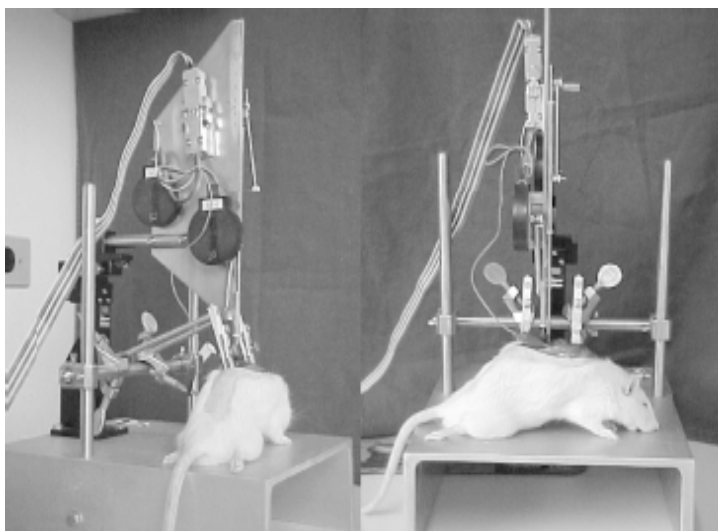
com o auxílio de um aparelho *Impactor New York University* (INYU) acoplados em um computador com um *software* específico que analisa as variáveis do trauma, como: velocidade da queda da haste, o momento do impacto e principalmente, a compressão sofrida pela medula é monitorada e expresso sob a forma de gráficos. O resultado desse gráfico determina se a lesão ocorreu dentro dos parâmetros exigidos para que o animal possa ser incluído no estudo. Este método permite produzir e reproduzir lesões medulares traumáticas de igual intensidade padronizando a lesão quanto à perda neuronal e o dano da substância branca. (HUANG et. al., 2007; HULSEBOSCH, 2002; METZ et. al., 2000).



**FIGURA 7:** Aspecto da medula pós - laminectomia em T10

#### 2.3.1. Posicionamento do animal no INYU

Para a reprodução do trauma da medula espinal, é necessário que o animal esteja preso ao aparelho INYU. Após o posicionamento correto do animal no centro do aparelho, duas garras metálicas são fixadas manualmente sobre os processos espinhosos e na musculatura paravertebral acima e abaixo da exposição cirúrgica, e apertadas por meio de uma rosca, para que não haja risco de deslocamento do animal. Como mostra a FIGURA 8.



**FIGURA 8:** Posicionamento do animal no INYU.  
(Fonte: Vialle, 2005)

### 2.3.2. Funcionamento do INYU

Com este aparelho, é possível adquirir dados como a velocidade de queda da haste impactora, o momento do impacto e principalmente a compressão sofrida pela medula são monitorados com a precisão, por meio de potenciômetros ópticos digitais.

A velocidade do impacto da haste contra a medula é estimada pela trajetória desta durante o período de dois milésimos de segundo que antecede o impacto. Os movimentos relativos da haste e da coluna vertebral do animal fornecem o afundamento máximo da haste na medula espinal e o tempo de compressão.

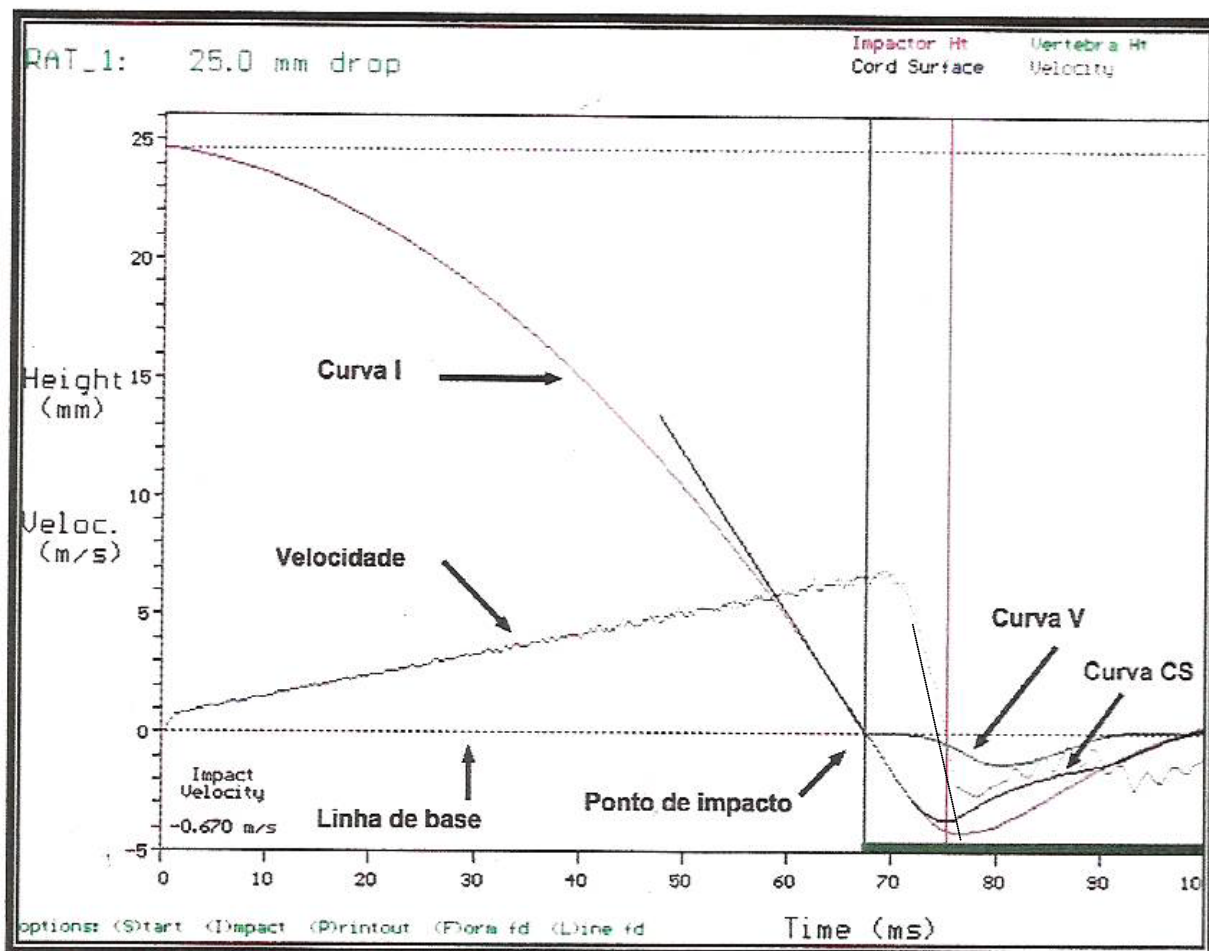
O *software* do INYU gera um gráfico de curvas do impactor (*Graph impact curves*), que mostram os dados referentes à lesão.

- Curva de impacto (**I**): representa a altura da cabeça impactora.
- Curva de deslocamento da coluna vertebral (**V**): representa o desvio ósseo medido pelo fio detector de movimento vertebral.
- Curva da Superfície Medular (**CS**): representa o desvio da superfície medular, é derivada das curvas I e V, pela subtração de V de I a partir do ponto de impacto.

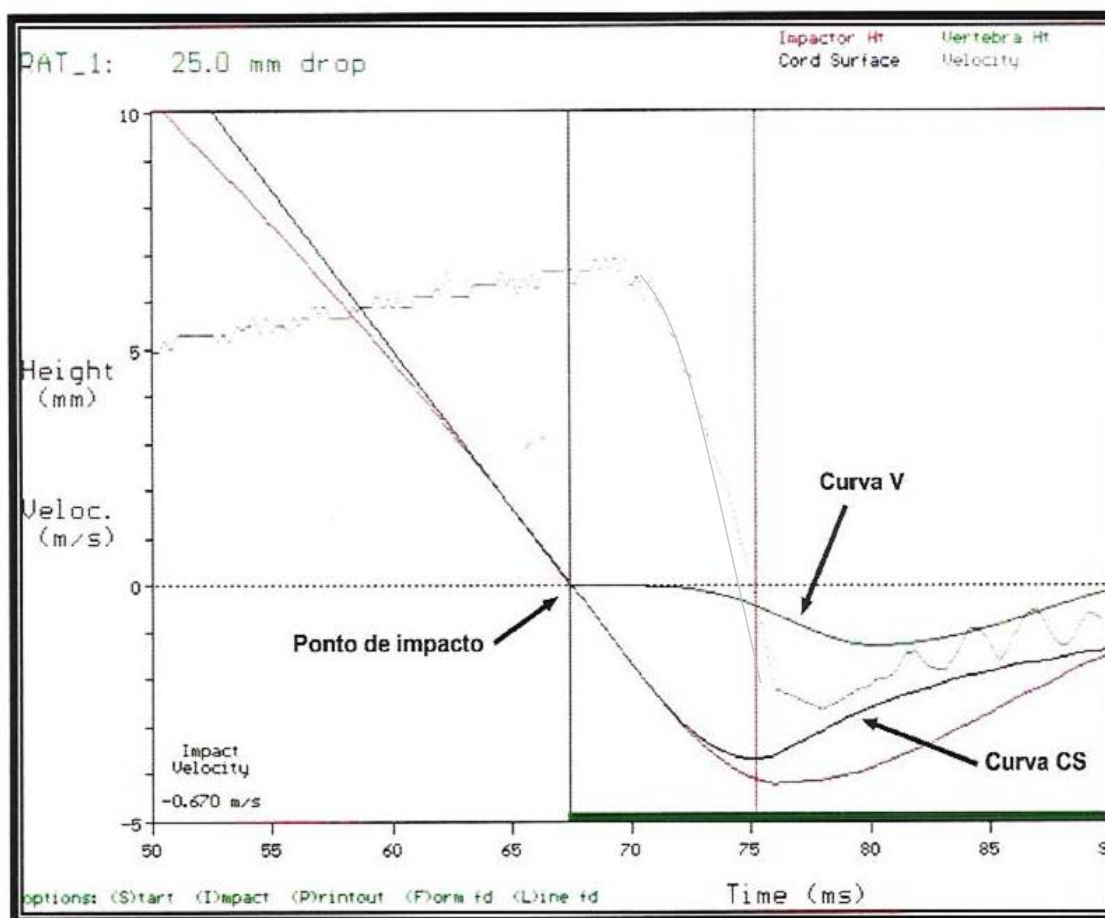
Estas curvas estão representadas nas FIGURAS 9 e 10. Na FIGURA 9 as linhas que representam estes dados são:

- Em vermelho: a posição da haste impactora durante a sua queda, partindo de 25 mm; a linha preta é a representação da velocidade.
- Em preto, partindo de zero, a linha ondulada mostra a velocidade da queda, crescente até o ponto de impacto e a linha pontilhada representa a linha de base.
- Em azul, a linha contínua identifica o ponto de impacto.
- Em vermelho, a linha vertical representa a haste impactadora.
- Em verde, a curva V, representa o deslocamento da vértebra após o impacto.
- Em azul, a curva CS, representa a deformidade pela medula.

A partir do ponto de impacto, o gráfico pode ser ampliado para destacar melhor as curvas V e CS, representada na FIGURA 10.



**FIGURA 9:** Gráfico que representa as curvas produzidas pelo impacto.



**FIGURA 10:** Gráfico ampliado que destaca, a partir do ponto de impacto, as curvas V e CS.

### 2.3.3. Parâmetros de Cálculo

#### Valores padronizados de lesão com o INYU

Variável	Altura (mm)	Velocidade (m/seg.)	Tempo (m/seg.)
Expectativa	25.000	-0.700	71.392
Verdadeiro	25.211	-0.700	76.576
Erro	0.211	0.000	5.184
Erro (%)	0.8	0.0	7.261

**Tabela 2:** Parâmetros de cálculo analisado pelo INYU para padronização da lesão medular.

Onde a “*Expectativa*” mostra o padrão das variáveis (Altura, Velocidade e Tempo) que deverão ser atingidos. O item “*Verdadeiro*” mostra os resultados adquiridos na lesão que foi realizada. O item “*Erro*” calcula a diferença entre “*Expectativa*” menos o item “*Verdadeiro*”, (*Expectativa* – *Verdadeiro*). E por último o item “*Erro (%)*” calcula a diferença entre “*Expectativa*” menos o item “*Verdadeiro*” em percentual.

#### 2.3.4. Cuidados no pós-operatório do Trauma da Medular espinal Experimental

Os animais foram acondicionados aos pares em gaiolas que continham alimento e água de fácil acesso. Devido à paralisia dos membros posteriores, os cuidados pós-operatórios incluíram a inspeção da ferida e expressão vesical a cada oito horas, pelo método de Credé, que consiste de uma massagem sobre a bexiga do animal para retirada de urina, sendo facilmente palpável quando distendida, no entanto conforme se deu a evolução positiva dos animais passou-se fazer esse procedimento a cada 24 horas. Para a inclusão no estudo, 48 horas após a (LMET), os animais foram avaliados por meio da Escala Funcional B.B.B., com o objetivo de confirmar a lesão medular deflagrada pelo INYU. Os animais que receberam escore menor ou igual ao 08 ( $\leq 08$ ) foram incluídos no estudo para passarem a etapa seguinte.

O item 08 na escala funcional é a sustentação plantar da pata com peso suporte em postura (quando parado) ou ocasional, freqüente, ou consistente suporte de peso na passada dorsal e nenhum apoio nas passadas plantares, movimentos suaves sem suportar o peso do corpo.



## **2.4. Obtenção das células da medula óssea: fração mononuclear**

### **2.4.1. Punção-aspiração da Medula**

Para a coleta de material da medula óssea para o isolamento das células derivadas da medula óssea, foi realizada punção-aspiração da medula óssea da crista ilíaca posterior da pelve, descrita a seguir.

Os ratos foram anestesiados com administração intramuscular de ketamina (50mg/kg) e xilasina (10mg/kg), colocados na posição em decúbito lateral, com o membro inferior em flexão. A assepsia do local a ser puncionado foi realizada com polivinilpirrolidona-iodo (PVPI - Presist®). As punções-aspiração da medula óssea foram realizadas, por seringas descartáveis (BD-Plastipak®) de 5 mL contendo heparina (liquemine 5.000 UI/ml) com uma agulha 25x8 21G1 (BD-Precision Glide®). Uma pequena quantidade de sangue da medula óssea (1-2 ml) foi aspirada e sendo processada imediatamente. Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas.

### **2.4.2. Isolamento da fração mononuclear**

O material coletado de cada animal foi colocado em tubo estéril de centrífuga de plástico de 15 ml. Logo após, completado este tubo até 12 ml, com meio de cultura: Meio Dulbecco Modificado por Iscove (MDMI), em solução tampão com 1% e antibiótico (penicilina e streptomina) e homogeneizado.

Seguiu-se a separação por gradiente de densidade em centrífuga (Ficoll-Hypaque,  $d = 1,077\text{g/m}^3$ , Sigma, St. Louis, MO) e submetido à 1400 rotação por minuto (rpm) durante 40 minutos à 22°C. Logo após, o tubo é levado ao fluxo laminar novamente, e retirado o anel esbranquiçado formado entre o meio e a solução gradiente.

É neste anel, onde se encontram as células-mononucleares. Procedeu-se outra centrifugação por 1500rpm por 10 minutos a 22°C.

Retirado da centrifuga o tubo, sendo o sobrenadante descartado, ficando as células mononucleares em um precipitado no fundo do frasco (pélete).

Após esta fase, procedeu-se a contagem das células.

#### 2.4.3. Identificação das células mononucleares

Amostras de células são analisadas por imuno-fenotipagem através de anticorpos: anti-CD34 (anti-CD34-APC [clone 58]) e anti-CD45 (PE-Cy5 [clone OX-1]) com o auxílio de citometria de fluxo. (FACScalibur, Becton and Dickson-USA).

#### 2.4.4. Quantificação das células

Para administração de células, foram realizadas as quantificações por contagem das células viáveis em câmara de NEUBAUER (hemocitômetro) com o auxílio do azul de Trypan.

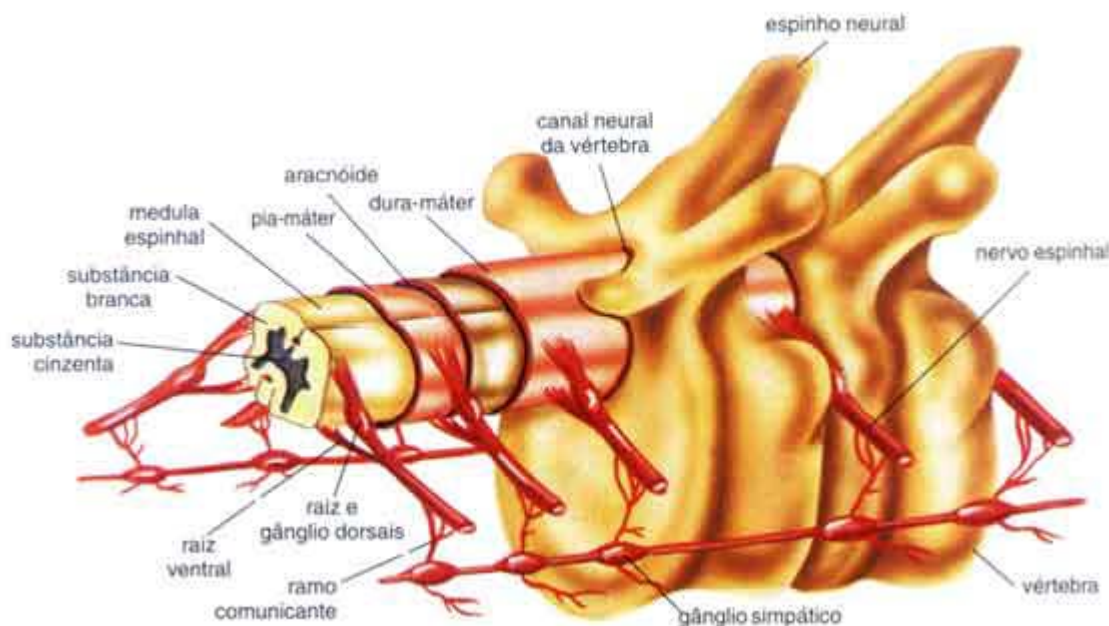
### 2.5. Transplante das células mononucleares

O transplante celular foi realizado á céu aberto:

- Os ratos foram anestesiados como previamente estabelecido;
- Ratos previamente, submetidos à laminectomias e exposição da dura-máter; (FIGURA 11).
- As células foram injetadas no espaço subaracnóideo intra-tecal (FIGURA 11), em uma concentração celular de  $10^5$  a  $10^6$  de células: CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> (89.4%, 0.41%) em um volume de 15µL, com auxílio da seringa de Hamilton (1701 Lt, Hamilton Bonaduz AG). Obs: as células foram diluídas em uma solução de albumina á 3% (ROUSSOS, 2005).
- Fechamento dos planos cirúrgicos;

- A partir do pós-operatório imediato os animais receberam medicação analgésica: paracetamol 50 mg/ Kg de peso dia.

OBS: Todo o procedimento e técnicas utilizadas foram realizados em “duplo cego”.



**FIGURA 11:** Estrutura medular.  
(Fonte: [www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa](http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa))

## 2.6. Adaptação ao meio líquido

Os animais foram escolhidos aleatoriamente para participar do Treinamento. Os Treinamentos Físicos foram feitos, sendo a natação, como opção; utilizando um aquário de 80 centímetros de largura por 40 centímetros de comprimento e 50 centímetros de altura. Tal aquário é subdividido em dois compartimentos para que os animais treinassem separadamente.

A temperatura da água se manteve em  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sendo que, todos os ratos do grupo do treinamento físico passaram obrigatoriamente por um período de adaptação ao meio líquido, consistindo em manutenção dos animais 10 minutos diários durante três dias. No primeiro dia, os animais foram adaptados por 10

minutos em uma coluna d'água de 20 centímetros, no segundo dia passaram por uma adaptação com a mesma duração de tempo, porém com 30 centímetros de altura da coluna d'água e finalmente no último dia se mantiveram por mesmo período de tempo com 40 centímetros d'água. Esta etapa proporcionou ao animal a adaptação ao ambiente, levando-se em conta que os animais que foram incluídos no estudo apresentam limitações motoras acentuadas devido ao trauma medular desenvolvida por meio do INYU.

## 2.7. Treinamento Físico

O treinamento físico propriamente dito após adaptação, consistiu em 60 minutos diários, 06 vezes por semana, durante 06 semanas, totalizando 36 dias de exercícios físicos.

Na primeira semana do treinamento, os animais passaram todo esse período sem sobrecarga. Essa sobrecarga tem como objetivo estimular os animais se movimentarem, já que a tendência dos ratos após uma boa adaptação ao meio líquido é a flutuação, esse objeto é constituído com chumbo como peso e preso ao tórax do animal. Na segunda semana os ratos foram submetidos ao treinamento com 1% do peso corporal, ou seja: 60 minutos com uma sobrecarga em média de 3,0 g.  $\pm 0,5$ g; dando seqüência aos treinamentos, na terceira semana os animais foram treinados com 2% do peso corporal: 60 minutos com sobrecarga de 6,0g.  $\pm 0,5$ g. e nas últimas três semanas de treinamento os ratos foram exercitados com 3% do peso corporal: 60 minutos com sobrecarga de 9g.  $\pm 0,5$ g. (KREGEL, KC. et. al., 2006; YALCIN, O. et. al., 2000) **(Anexo 2)**.

Estudos em fisiologia do exercício têm utilizado animais para simular com mais exatidão as condições de benefícios físicos freqüentemente observadas em humanos. Ressaltando que, a natação tem sido muito empregada, pois é uma habilidade inata aos ratos e os estudos realizados utilizando esse modelo revelam a ocorrência de adaptações ao treinamento físico semelhante às aquelas observadas em humanos (GOBATTO et al, 2001) .

## **2.8. Análise da concentração do lactato sanguíneo**

Após adaptação dos animais, estes fizeram um teste de 10 minutos sem percentual de carga para determinar a concentração de lactato sanguíneo após o teste, completando 6 semanas de treinamento, foram realizados novos testes com o objetivo de caracterização da amostra dos animais treinados.

A análise do lactato foi feita com o analisador portátil da marca Accutrend®, e para tal é extraído 25  $\mu$ L de sangue da cauda do animal no momento da finalização dos 10 minutos, sendo cada animal imediatamente secado após o término do teste.

A coluna de água para o último dia de adaptação, para o teste e para o treinamento propriamente dito se manteve em 40 centímetros, o suficiente para que os ratos não se apoiarem com a calda no fundo do aquário (CONTARTEZE, R.V.L., 2006; HARRI, KUUSELA, 1986).

## **2.9. Escala funcional (BBB)**

Após a contusão da medula espinal, os animais foram submetidos à análise produzida através do exame físico pelo escore BBB. Este escore BBB é uma padronização internacional para o estudo da lesão medular através de parâmetros clínicos permitindo que se tenha certeza que a paralisia foi obtida e não houve recuperação motora neste prazo. Foram considerados quatro momentos determinantes: Momento I: antes do trauma; Momento II: 48 horas após o trauma, antes da Terapia Celular; Momento III: 48 horas depois da Terapia Celular e Momento IV: 48 dias após a terapia celular e treinamento físico (BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C.; 1995). No entanto, os animais foram acompanhados durante todos os 48 dias da pesquisa, passando por freqüentes avaliações a cada 48 horas, com objetivo de controle de sua evolução motora.

Este índice é determinado por avaliação de dois observadores após 4 minutos de inspeção do rato. A observação motora foi de acordo com estudos

randomizados, onde os observadores não tiveram ciência para qual o tipo de terapia foi utilizada. 21 comportamentos envolvendo tronco, cauda e membros posteriores são anotados:

### **Avaliação Funcional Escala Basso, Beatie and Bresnahan (B.B.B.)**

A escala BBB observa os movimentos da articulação do quadril, joelho, tornozelo, posição do tronco, rabo e patas traseiras. A partir destas observações, foram atribuídos pontos de zero a 21, sendo zero o correspondente à ausência total de movimentos e 21 à presença de movimentos normais.

0 - não observação de movimento nos membros posteriores (MP).

1 - suave movimento de uma ou duas articulações, normalmente o quadril e/ou joelho.

2 - extenso movimento de uma articulação ou extenso movimento de uma articulação e suave movimento de uma outra articulação.

3 - extenso movimento de duas articulações do MP.

4 - suave movimento de mais de três articulações MP.

5 - suave movimento de duas articulações e extenso movimento de uma terceira.

6 - extenso movimento de duas articulações e suave movimento de uma terceira ou extenso movimento em todas as três articulações do MP.

7 - largo movimento com nenhum peso de suporte ou colocação plantar da pata com nenhum peso de suporte.

8 - sustentação plantar da pata com peso suporte em postura (quando parado) ou ocasional, freqüente, ou consistente suporte de peso na passada dorsal e nenhum apoio na passada plantar, movimentos suaves sem suportar o peso do corpo.

9 - ocasional suporte de peso na passada plantar, nenhum MA-MP coordenação.

10 - freqüência constante do suporte de peso na passada plantar, nenhuma MA-MP coordenação.

11- freqüência constante do suporte de peso na passada plantar e ocasional MA (movimento anterior) de coordenação.

12- freqüência constante do suporte de peso na passada plantar e freqüente MA-MP de coordenação.

13 - constante suporte de peso na passada plantar, constante MS-MP de coordenação;

14 - constante passada plantar e constante MA-MP com coordenação e predominância da posição das patas em rotação (interna ou externa) quando começa o contato inicial com a superfície antes mesmo de levantar no fim da postura ou freqüente passada plantar, constante MA-MP com coordenação e ocasional passada dorsal.

15 – constante passada plantar e constante MA-MP coordenados; e nenhum movimento dos dedos dos pés ou ocasional movimento dos dedos dos pés durante o avanço do membro seguinte. Predominante posição da pata, paralela ao corpo no contato inicial.

16 – constante passada plantar e constante coordenação MA-MP durante o andar; e dedos dos pés livres ocorrem freqüentemente durante o avançar dos membros dianteiros, predominantemente a posição das patas estão em paralelo no contato inicial e rodado ao se levantar.

17- constante passada plantar e constante coordenação MA-MP durante o andar; e os dedos dos pés livres ocorrem freqüentemente durante o avançar dos membros dianteiros, a posição das patas estando paralelas no contato e ao levantar-se.

18- constante passada plantar e constante coordenação MA-MP durante o andar, os dedos dos pés livres ocorrem constantemente durante o avançar dos membros dianteiros predominantemente a posição das patas estão paralelas no contato inicial e rodada ao levantar-se.

19- constante passada plantar e constante coordenação MA-MP durante o andar, os dedos dos pés livres ocorrem constantemente durante o avançar dos membros dianteiros predominantemente a posição das patas estão paralelas no contato inicial e ao levantar-se; o rabo mantém-se para baixo o tempo ou apenas parte dele.

20- constante passada plantar e constante coordenação ao andar, constante movimento livres dos dedos dos pés; predominantemente posições das patas estão paralelas no contato inicial e ao levantar-se; instabilidade do tronco; rabo constantemente para cima.

21- constante passada plantar e andar coordenado, constante movimentos livres dos pés, posição das patas predominantemente paralelas durante a postura, constante estabilidade de tronco, rabo constantemente para cima.

## **2.10. Procedimento de Eutanásia e remoção da medula espinhal**

Os animais foram submetidos à eutanásia, onde receberam a dose letal (DL50) (148 mg/kg) do anestésico Xilasina (REBUELTO, 2002).

Para remoção de medula espinhal, foram administrados via incisão, sobre o átrio esquerdo, 300 ml de solução de formalina 10% tamponada (pH 6.8, com 4,5 g/L de fosfato monobásico de sódio e 6,5g/L de fosfato dibásico de sódio), permitindo melhores condições teciduais para o estudo histopatológico.

Após a fixação da substância, a estrutura vertebral foi retirada, devidamente identificada e estocada em frascos individuais, contendo a mesma solução tamponada, permanecendo submersos até o estudo histopatológico.

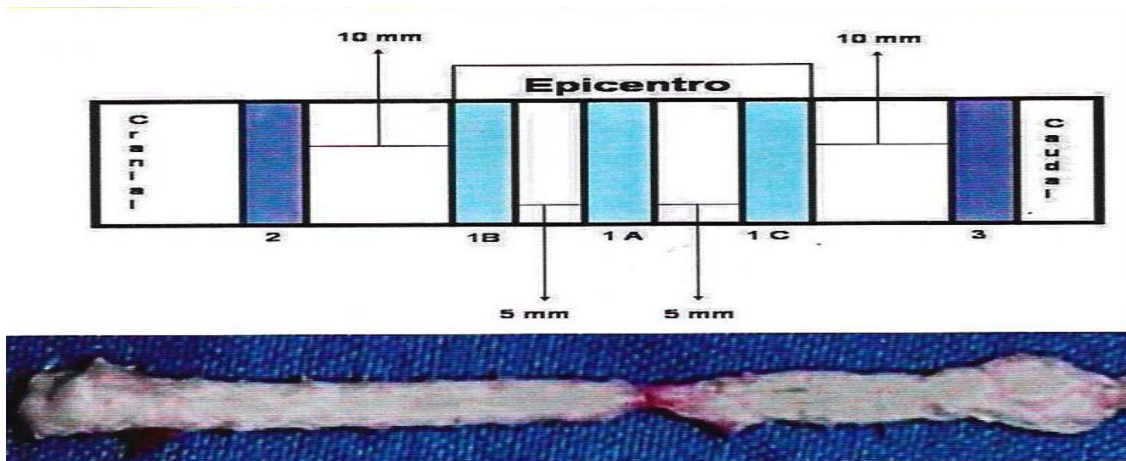
## **2.11. Preparo e a avaliação Histopatológica**

O preparo das lâminas e sua interpretação seguem as padronizações de acordo com VIALLE (2005) e VIALLE (2001). Primeiramente, a estrutura vertebral, submersa em solução tampão, passa por um processo de dissecação para retirada da medula espinal.

O material obtido foi fixado em solução tamponada de formaldeído 10%, os espécimes foram então submetidos a um processador automático de tecidos com inclusão de parafina, seguindo por cortes de 5 micrômetros de intervalo a partir da zona central da medula. De cada espécime, cinco regiões foram observadas (FIGURA 12):



1. Centro da lesão (06 cortes).
2. 5 mm cranial ao epicentro da lesão (06 cortes).
3. 5 mm caudal ao epicentro da lesão (06 cortes).
4. 10 mm cranial do epicentro da lesão (03 cortes).
5. 10 mm caudal do epicentro da lesão (03 cortes).



**FIGURA 12:** Desenho, mostrando áreas selecionadas para estudos histopatológicos, foto mostra medula após dissecação da coluna vertebral.

Após a devida identificação, os cortes foram corados pelos métodos de Hematoxilina-eosina (H&E) e combinado com Cresil-violeta para neurônios. Em cada área descrita foram observados os critérios de lesão da medula espinal estabelecidos previamente na literatura (BLACK et. al., 1986; FILKENSTEIN et. al., 1990).

## 2.12. Tratamento estatístico

Para todas as análises dos resultados, foi usado o pacote estatístico *Statistica 6.0 for Windows*.

Para análise da Avaliação Funcional da Escala Basso, Beatie e Bresnahan (B.B.B.), foi utilizado o teste não paramétrico de kruskal-Wallis, com post-hoc de U de Mann-Whitney e posteriormente para correção do  $p$  valor, foi utilizado o teste de Bonferroni.

Para análise de lactato sanguíneo, foi utilizado o teste “t” dependente para análise pré e pós treinamento, e teste “t” independente para comparar os momentos (início, final e diferença) entre os dois grupos treinados fisicamente.

### 3. RESULTADOS

Para todas as análises dos resultados, foi usado o pacote estatístico Statistica 6.0 for Windows.

#### 3.1. Resultado dos parâmetros da lesão

Na (TABELA 3), analisou-se média e desvio padrão dos 48 animais, em três variáveis: altura (mm), velocidade (m/seg) e tempo (ms), com o objetivo de padronizar as lesões, aproximando-se dos valores pré-determinados na (TABELA 2). O erro é aceitável dentro das seguintes medidas: altura até 0,5 milímetros; velocidade até 0,035 metros por segundo e tempo até 5 milissegundos.

##### Valores da lesão do INYU

	Altura (mm)		Velocidade (m/seg)		Tempo (ms)	
	Média	± dp	Média	± dp	média	± dp
<b>Verdadeiro (n=48)</b>	24,947	± 0,245	-0,677	± 0,008	69,744	± 2,838
<b>Erro</b>	-0,042	± 0,246	0,024	± 0,008	-1,648	± 2,838
<b>Erro (%)</b>	0,8	± 0,6	3,4	± 1,2	4,131	± 1,91

**TABELA 3:** Representa média e desvio padrão, dos 48 animais lesionados através do INYU, que foram incluídos no estudo.

#### 3.2. Resultado da escala funcional (BBB)

Na escala funcional (BBB) representada na (TABELA 4,5 e 6), analisou-se a média, desvio padrão, escala mínima e escala máxima dentro dos quatro grupos; em três momentos: início, final e diferença (final – inicial). O primeiro grupo (N=12) foi denominado: Sedentário com meio (grupo que não recebeu terapia celular com células-tronco e não foi estimulado com exercício físico); o segundo grupo (N=12) foi denominado: Sedentário com célula (grupo que recebeu terapia celular com células-tronco, mas não foi estimulado com exercício físico); o terceiro grupo (N=12) foi denominado: Treinado com meio (grupo que não recebeu terapia

celular com células-tronco, mas foi estimulado com exercício físico) e o quarto grupo (N=12) foi denominado: Treinado com célula (grupo que recebeu terapia celular com células-tronco e foi estimulado com exercício físico).

No primeiro momento o início (TABELA 4), não apresentou diferença estatística entre os quatro grupos. Isso significa que os quatro grupos após 48 horas da lesão medula, não foram considerados diferentes de modo estatisticamente significativo ( $p=0,3326$ ). Já no segundo momento o final (TABELA 5), apresentou após 48 dias de acompanhamento, diferença estatística entre os grupos ( $p=0,0027$ ). No último momento a diferença (TABELA 6), mostrou-se estatisticamente significativa ( $p=0,0007$ ). Análise foi feita com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para determinar as diferenças entre os grupos em cada momento, foi feito o post-hoc teste U de Mann-Whitney e posteriormente foi aplicado o teste de correção de Bonferroni que determinou o nível do “ $p$ ” valor ( $p < 0,008$ ). No primeiro momento não houve diferença estatisticamente significativa. Já no segundo momento, houve diferença estatística significativa do grupo Treinado com célula em relação aos grupos que não participaram do treinamento físico: Treinado com célula vs Sedentário com meio ( $p=0,0004$ ) e Treinado com célula vs Sedentário com célula ( $p=0,0045$ ). Porém as maiores diferenças estatísticas foram encontradas no grupo Treinado com célula em relação aos demais grupos no último momento. Onde mostrou-se diferente estatisticamente significativo entre: Treinado com célula vs Sedentário com meio ( $p=0,0000$ ); Treinado com célula vs Sedentário com célula ( $p=0,0003$ ) e Treinado com célula vs Treinado com meio ( $p=0,0003$ ).

#### **Avaliação Funcional B.B.B. (início).**

Grupos	Média	Início		
		$\pm dp$	Mín.	Máx.
(a) Sedentário com meio	3,33	$\pm 2,81$	0	7
(b) Sedentário com célula	1,75	$\pm 2,67$	0	7
(c) Treinado com meio	2,00	$\pm 2,37$	0	6
(d) Treinado com célula	1,67	$\pm 2,23$	0	6
<b>Valor de P</b>		0,3326		

**TABELA 4:** Valores referentes à Avaliação Funcional Escala Basso, Beatie e Bresnahan (B.B.B.) no início.

**Avaliação Funcional B.B.B. (final).**

Grupos	Média	Final		
		± dp	Mín.	Máx.
(a) Sedentário com meio	11,42 <sup>d</sup>	± 3,60	7	18
(b) Sedentário com célula	11,75 <sup>d</sup>	± 4,33	6	20
(c) Treinado com meio	13,25	± 2,99	9	20
(d) Treinado com célula	17,17 <sup>a,b</sup>	± 3,01	11	20
Valor de P		0,0027*		

**TABELA 5:** Valores referentes à Avaliação Funcional Escala Basso, Beatie e Bresnahan (B.B.B.) no final.

- **a;b;c e d:** representa valores diferente estatisticamente significativos. ( $p < 0,008$ )
- **\*** : representa valores diferentes estatisticamente significativos. ( $p < 0,008$ )

**Avaliação Funcional B.B.B. (diferença).**

Grupos	Média	Diferença		
		± dp	Mín.	Máx.
(a) Sedentário com meio	8,08 <sup>d</sup>	± 3,40	1	12
(b) Sedentário com célula	10,00 <sup>d</sup>	± 3,16	6	14
(c) Treinado com meio	11,25 <sup>d</sup>	± 2,18	9	16
(d) Treinado com célula	15,75 <sup>a,b,c</sup>	± 2,67	11	19
Valor de P		0,0007*		

**TABELA 6:** Valores referentes à Avaliação Funcional Escala Basso, Beatie e Bresnahan (B.B.B.) na diferença (final – início).

- **a;b;c e d:** representa valores diferente estatisticamente significativos. ( $p < 0,008$ )
- **\*** : representa valores diferentes estatisticamente significativos. ( $p < 0,008$ )

Na (TABELA 7), analisou-se a diferença (final – inicial) em percentual e não em números absolutos como na (TABELA 6).

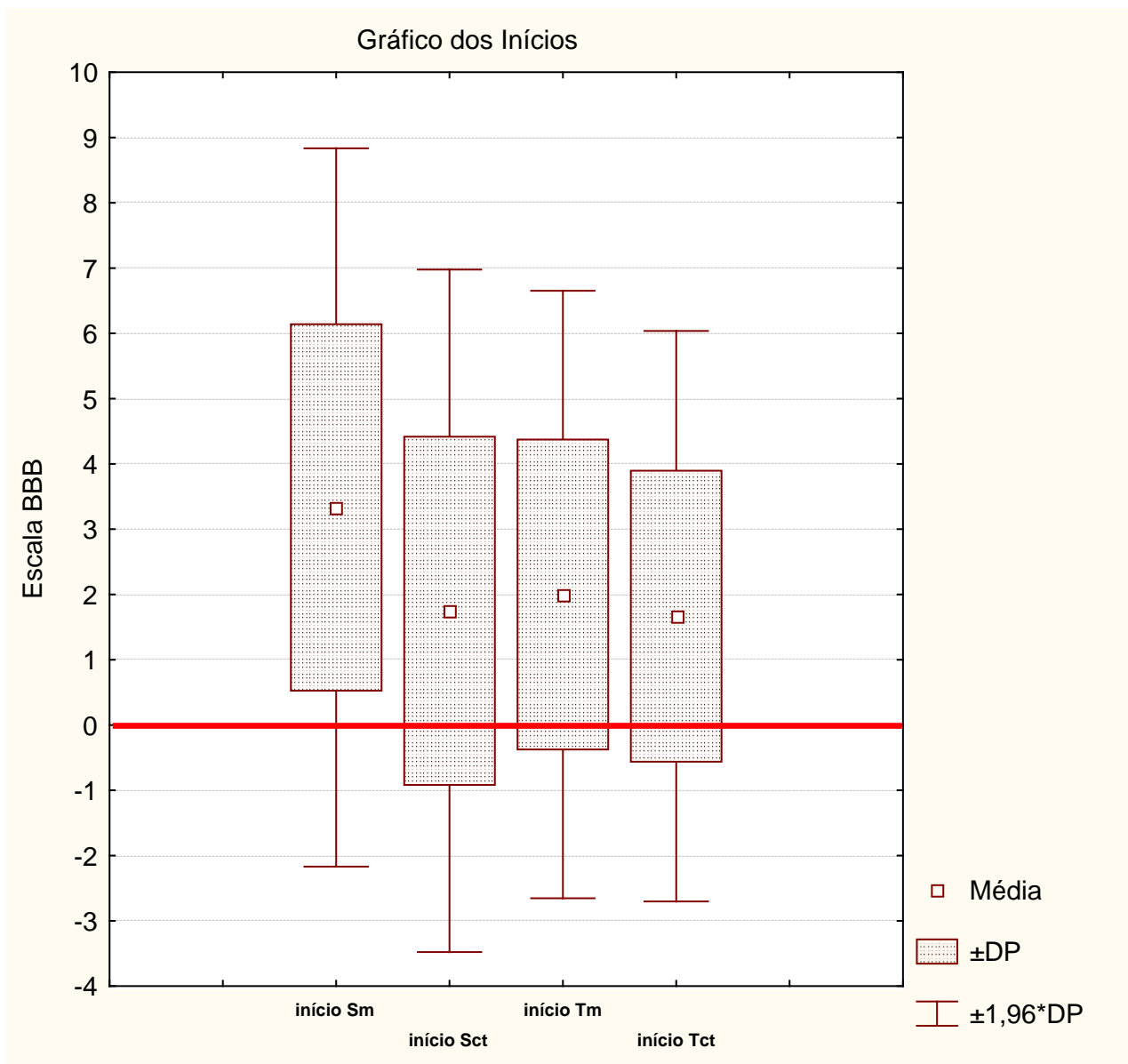
**Avaliação Funcional B.B.B. (diferença) em percentual.**

Grupos	Início	Final	Diferença (%)
Sedentário com meio	3,33	11,42	243 %
Sedentário com célula	1,75	11,75	571 %
Treinado com meio	2,00	13,25	563 %
Treinado com célula	1,67	17,17	930 %*

**TABELA 7:** Valores referentes à diferença em percentual da Avaliação Funcional Escala B.B.B.

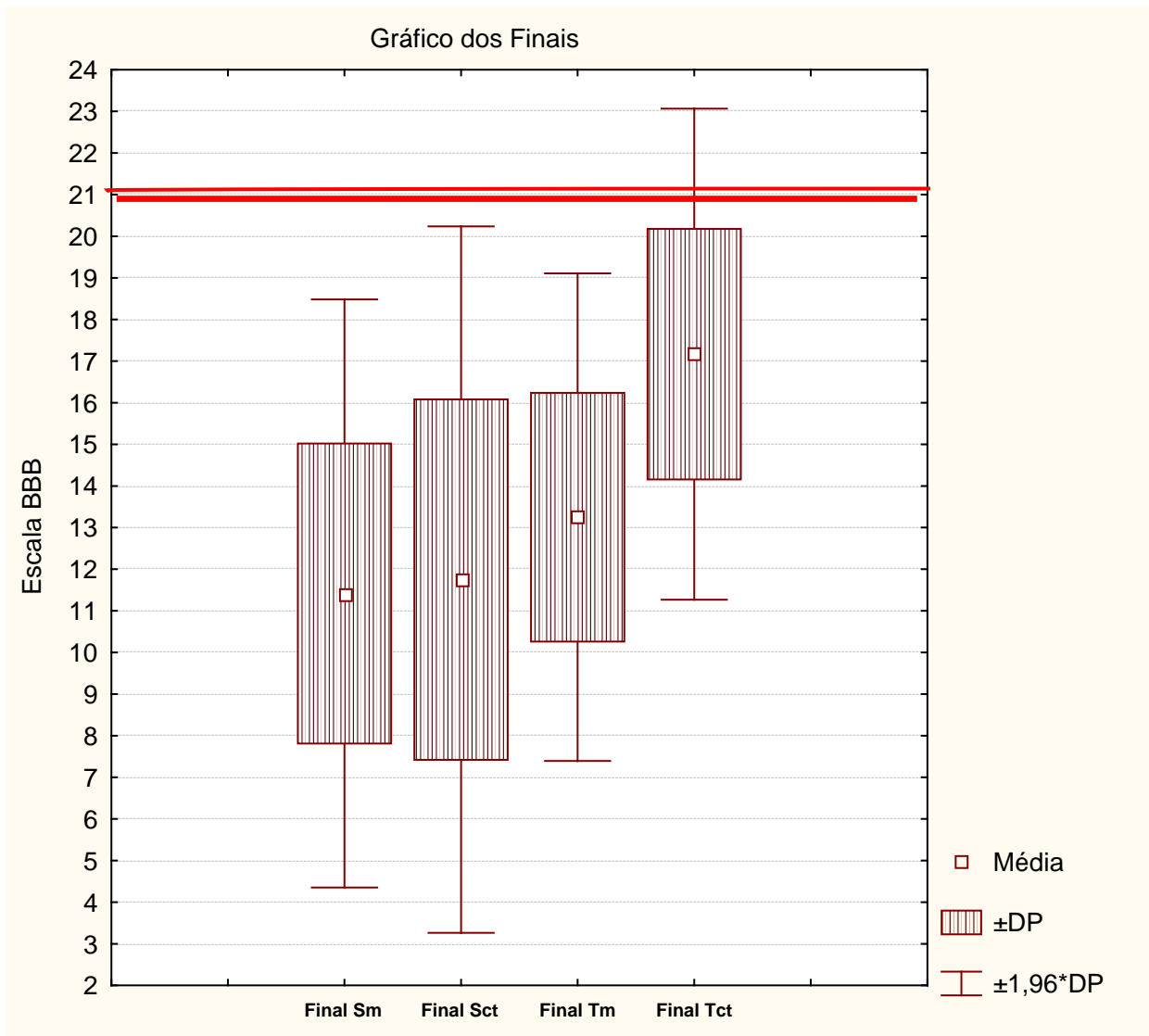
- **\*** : representa valores diferentes estatisticamente significativos. ( $p < 0,008$ )

### 3.2.1. Gráfico Comparativo da Escala BBB inicial



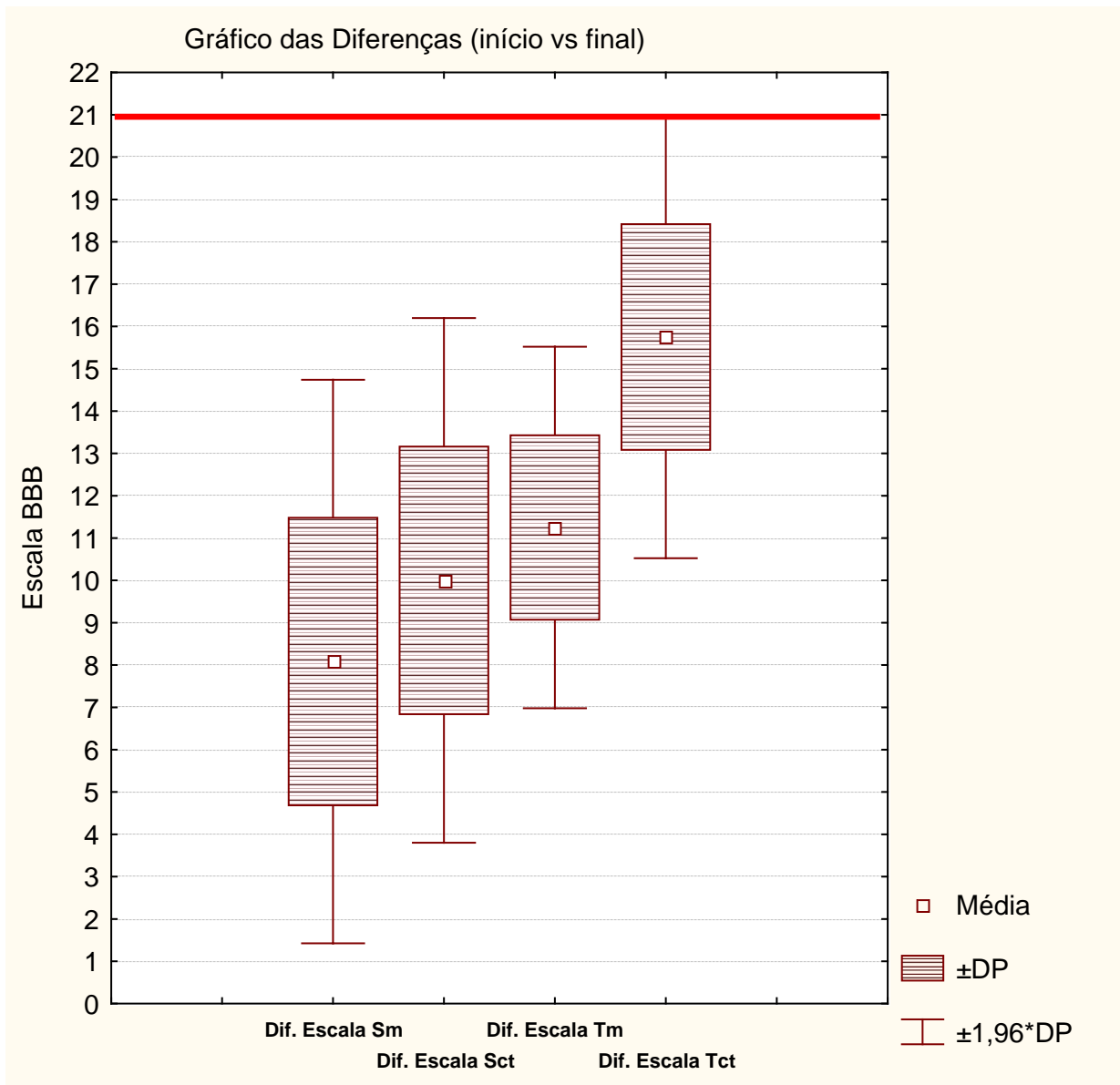
**GRÁFICO 1:** Média e desvio padrão da primeira avaliação da escala BBB para os quatro grupos: **"Sm"**, sedentários com meio (sem células-tronco); **"Sct"**, sedentários com células-tronco; **"Tm"**, treinados com meio (sem células-tronco) e **"Tct"**, treinados com células-tronco.

### 3.2.2. Gráfico Comparativo da Escala BBB Final



**GRÁFICO 2:** Média e desvio padrão da última avaliação da escala BBB para os quatro grupos: “**Sm**”, sedentários com meio (sem células-tronco); “**Sct**”, sedentários com células-tronco; “**Tm**”, treinados com meio (sem células-tronco) e “**Tct**”, treinados com células-tronco.

### 3.2.3. Gráfico Comparativo da Escala BBB diferença (início vs final)



**GRÁFICO 3:** Média e desvio padrão da diferença (FINAL – INÍCIO), avaliação da escala BBB para os quatro grupos (escala inicial menos a escala final): “**Sm**”, sedentários com meio (sem células-tronco); “**Sct**”, sedentários com células-tronco; “**Tm**”, treinados com meio (sem células-tronco) e “**Tct**”, treinados com células-tronco.



### 3.3. Resultado da concentração do lactato

Na análise de lactato sangüíneo é representada na (TABELA 8); analisou-se a média e desvio padrão dentro dos dois grupos que passaram pelo período de seis semanas de treinamento: Treinado com meio e Treinado com célula; em dois momentos distintos: início e final. Analisou-se também, os dois momentos em relação aos dois grupos.

Na (Tabela 8), mostrou que houve diferença estatística significativa do momento *início* para *final* em ambos os grupos. O grupo Treinado com meio ( $p=0,0054$ ) e o grupo Treinado com célula ( $p=0,0004$ ). Análise feita com o teste T dependente para comparar o pré e o pós dos dois grupos. Porém, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa dos momentos: *início* e *final*. Quando são confrontados os grupos: Terapia com meio vs Terapia com célula. Nos dois momentos o valor de ( $p$ ) foi maior que 0,05. No *início* ( $p=0,756$ ) e no *final* ( $p=0,267$ ). Análise feita com o teste T independente para comparar os momentos entre os grupos.

#### Valores referentes à concentração de lactato

Grupos	INICIO (mM/L)		FINAL (mM/L)		(a) Valor de p
	Média	± dp	Média	± dp	
Treinado com meio	5,30 *	± 0,90	4,25 *	± 0,56	0,005432 *
Treinado com célula	5,49 †	± 0,99	3,98 †	± 0,79	0,000488†
(b) Valor de p	0,756		0,267		

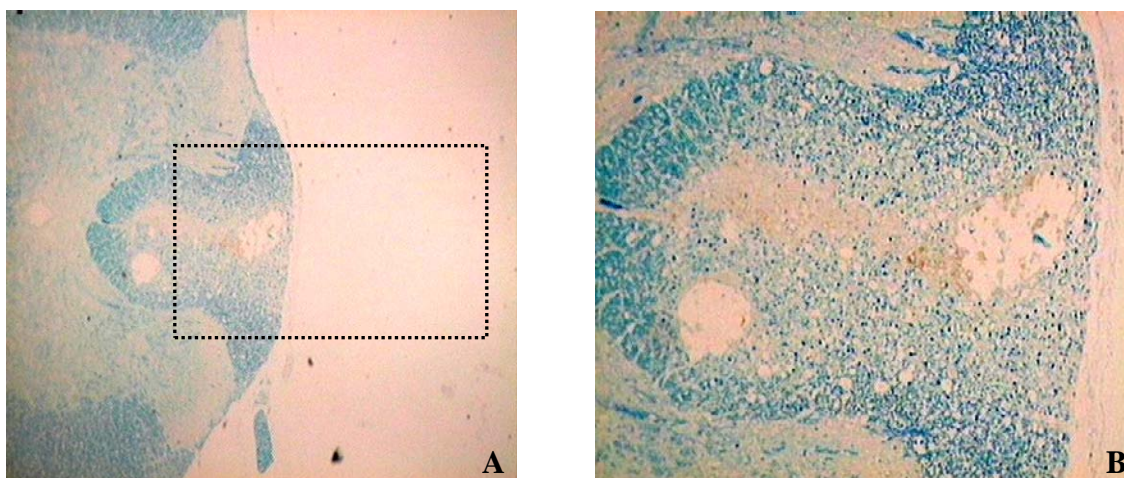
**TABELA 8:** Valores referentes à concentração de Lactato, na comparação entre os dois momentos: início e final. **(a):** Valores de “p” referentes à comparação entre início e final em cada grupo. **(b):** Valores de “p” referentes à comparação entre os dois grupos treinamento nos dois momentos.

\* - representa valores diferentes estatisticamente entre início e final referente ao grupo Treinado do meio. ( $p \leq 0,05$ ).

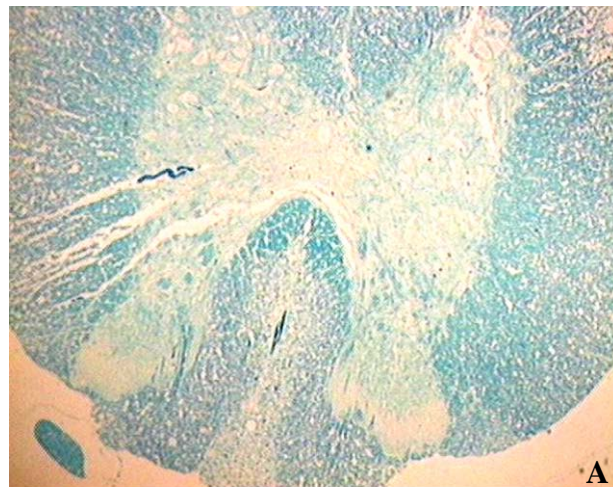
† - representa valores diferentes estatisticamente entre início e final referente ao Grupo Treinado com células-tronco. ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4. Resultado da Histopatologia

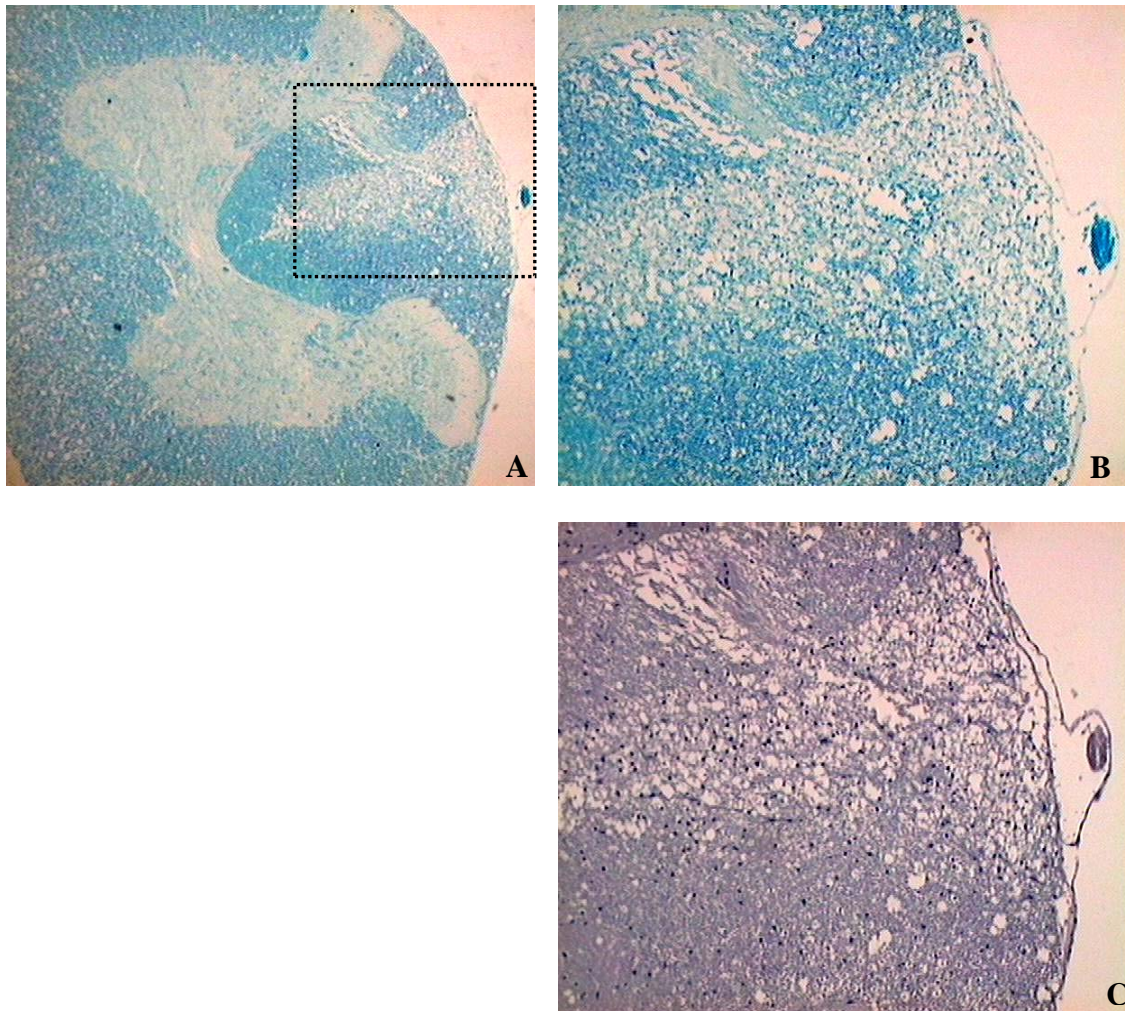
Com relação à análise histopatológica demonstradas nas FIGURAS 13, 14, 15, 16, 17 e 18. A confecção das lâminas a partir dos cortes seguiu o método habitual, na escolha dos corantes hematoxilina-eosina (H&E) e cresil violeta (CV) teve razões técnicas. A coloração com H&E é relativamente simples e facilmente reproduzível, na qual se obtém núcleos corados em azul e citoplasma em várias tonalidades de vermelho, permitindo a identificação dos componentes tissulares qualitativos. A técnica do cresil violeta é o método histoquímico de escolha para a demonstração de neurônio.



**FIGURAS 13:** Imagem de corte histopatológico da medula espinal do animal sedentário e não recebeu células. Escala funcional BBB era: *início* 2, *final* 12. **(A)** (CVx4); **(B)** (CVx10). Cresil violeta (CV).

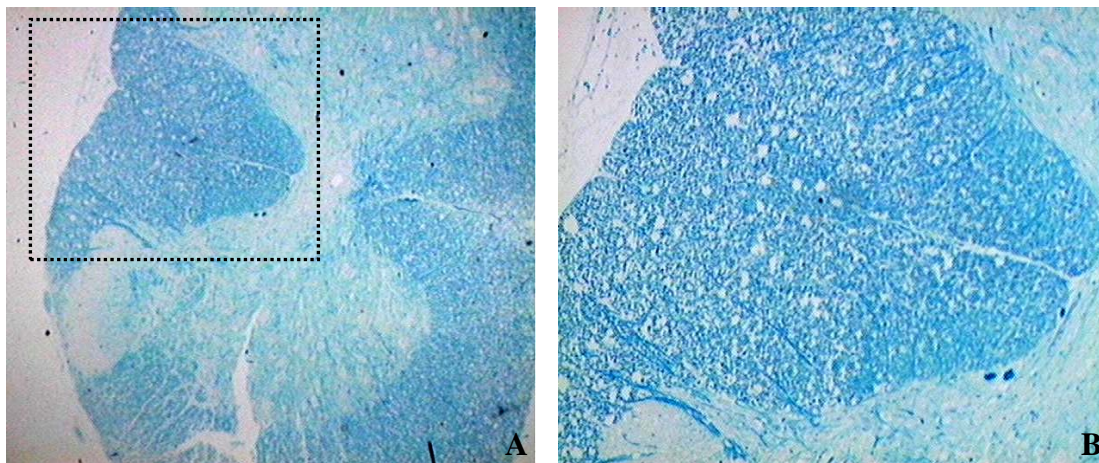


**FIGURA 14:** Imagem de corte histopatológico da medula espinal do animal sedentário e que recebeu células. Escala funcional BBB era: *início* 0, *final* 11. **(A)** (CVx4). Cresil violeta (CV).

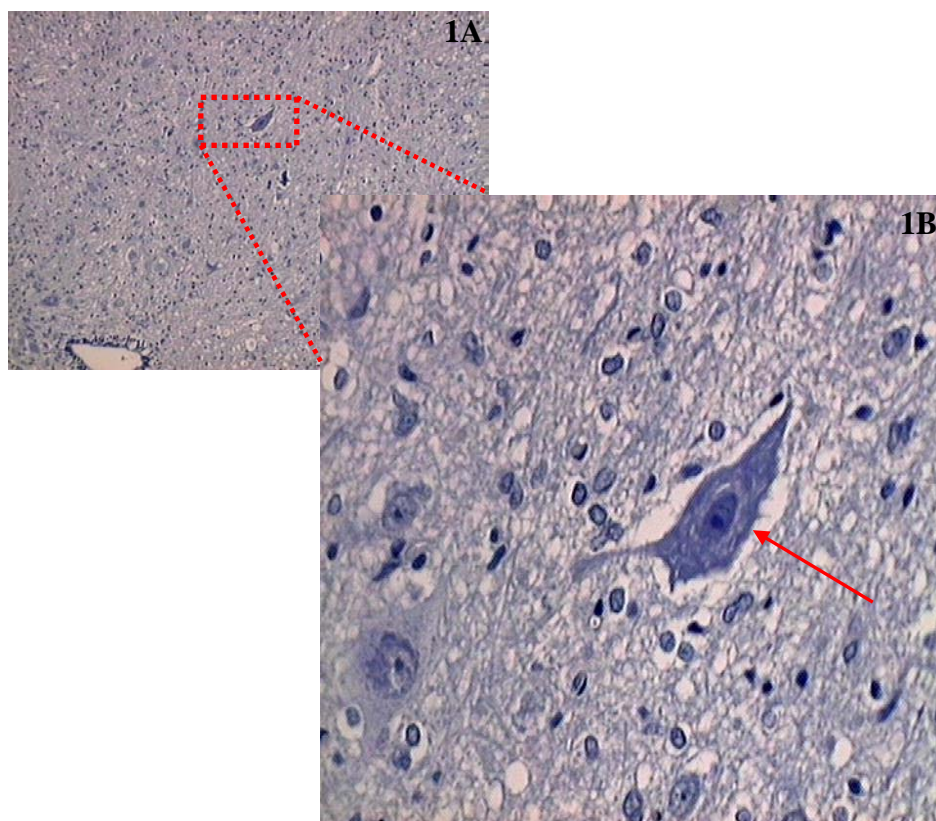


**FIGURA 15:** Imagem de corte histopatológico da medula espinal do animal treinado e que não recebeu células. Escala funcional BBB era: *início 2, final 12*. **(A)** (CVx4); **(B)** (CVx10); **(C)** (H&Ex10). Cresil violeta (CV). Hematoxilina-eosina (H&E).

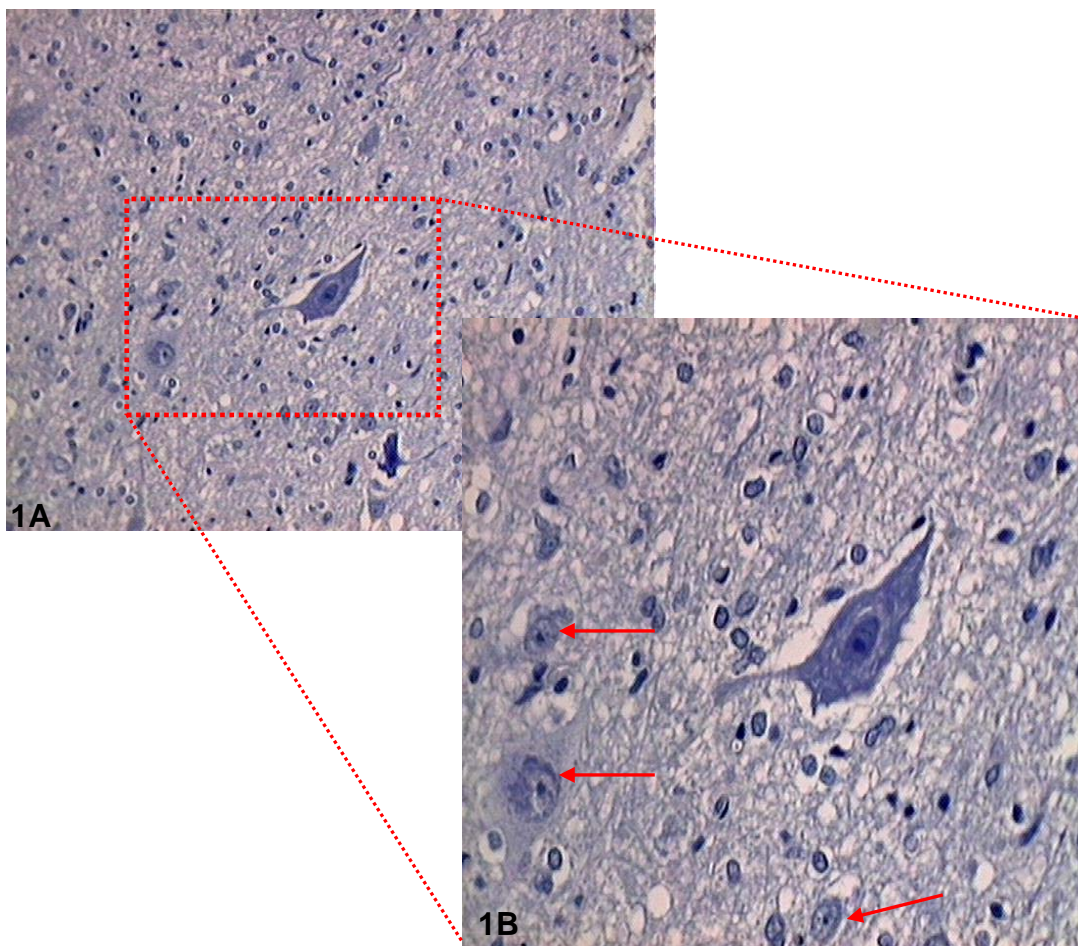




**FIGURA 16:** Imagem de corte histopatológico da medula espinal do animal treinado e que recebeu células. Escala funcional BBB era: *início* 1, *final* 14. **(A)** (CVx4); **(B)** (CVx10). Cresil violeta (CV).



**FIGURA 17:** Detalhe da substância cinzenta, onde se observa o neurônio (flecha). **(1A)** (H&Ex10); **(1B)** (H&Ex40).



**FIGURA 18:** Detalhe da substância cinzenta, onde se observa astrócitos protoplasmáticos (flechas). **(1A)** (H&Ex20); **(1B)** (H&Ex40).

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1. Discussão dos Parâmetros da Lesão**

O método da queda da haste foi realizado na altura em T10 por dois básicos motivos: a largura do canal, que diminui significativamente acima deste nível e conseqüentemente dificulta o posicionamento da barra responsável pela lesão medular, e o fato de que lesões mais altas deflagram dificuldades respiratórias e alterações cardiovasculares. Estas dificultam a manipulação dos animais após o experimento, e podem causar hipóxia e hipertensão, afetando negativamente qualquer processo de recuperação (YOUNG, 2002).

A única forma de verificar o correto funcionamento do impactor foi através da análise dos números que estão representados na (TABELA 3), onde podemos comparar os dados *Verdadeiros* de Altura, Velocidade e Tempo, que foram realmente obtidos durante os 48 LMET, deflagrados pelo INYU. Com os dados padronizados, representados na (TABELA 2), onde tais dados foram confirmados como dentro das especificações para as quais o aparelho foi regulado.

Segundo GWAK et. al. (2004); KESSLAK (2003) e METZ et. al. (2000) o método (weight-drop technique), é reconhecido como mais reprodutível e que mais se assemelha á lesão medular traumática em humanos.

### **4.2. Discussão da Escala funcional (BBB)**

Segundo BARROS (2008); PENG, et. al. (2006); VIALLE, et. al. (2002) e BASSO, et. al. (1995) a escala (BBB) é baseada em características funcionais que sugerem a recuperação progressiva da paralisia até a locomoção normal. Apesar de ser considerada uma avaliação subjetiva, observaram-se significantes diferenças entre os movimentos realizados pelos animais que sofreram laminectomia daqueles que sofreram grave contusão (LMET), indicando que a escala é válida e possui alto grau de sensibilidade e satisfatória reprodutibilidade.

A lesão medular espinal traumática é considerada um problema complexo e delicado de se abordar, devido ao fato que envolve uma lesão traumática súbita à medula espinal, que tem como conseqüências: déficits motores, sensitivos e autonômicos; sempre levando em consideração o nível e a intensidade da lesão.

Atualmente, com o avanço das terapias, mais especificamente a terapia celular, há trabalhos que a sugerem para reabilitar as funções perdidas, como propuseram (ONIFER et. al., 2007; PARR et. al., 2007; KOCSIS et. al., 2002; KUNKEL-BAGDEN et. al., 1993).

Com a evolução das pesquisas sobre lesões medulares, surgiu a necessidade da padronização de um método capaz de reproduzir de maneira experimental, lesões medulares semelhantes quanto ao volume e ao dano medular (VIALLE, L.R.G., 2001).

As lesões medulares experimentais abertas, isto significa, com exposição da medula, são consideradas as que criam as melhores condições de estudo. O uso com modelos animais no trauma da medula espinal, permitiu avanços significativos na compreensão das alterações que seguem a lesão medular. Acredita-se que dois principais eventos fisiopatológicos são responsáveis pelos déficits neurológicos associado ao trauma da medula espinal. Os mecanismos responsáveis pela lesão primária: força de compressão, contusão, cisalhamento e tração, não são passíveis de tratamento. Porém, na medicina regenerativa, há estudos mostrando que existe a possibilidade da regeneração tecidual utilizando terapia celular, principalmente utilizando células-tronco precursoras neurais como propuseram (NERI et. al., 2008; CORTI et. al., 2007; WEBBER et. al., 2007) e células-tronco totipotentes (embrionárias), em estudos descritos por (LI et. al., 2007; HARPER et. al., 2004; MCDONALD et. al., 1999).

Os processos considerados secundários, relacionados com o trauma da medula espinal incluem: edema, isquemia, inflamação, toxicidade celular, alterações na homeostase iônica, liberação excessiva de citocinas, ativação enzimática alterada e necrose celular (KURITA et. al., 2005).

Analisando os resultados obtidos pela escala funcional (escala BBB), sugere-se que pelo menos um destes mecanismos foi neutralizado. Devido ao fato que



durante todo o processo da pesquisa, as células utilizadas para terapia celular, foram as mononucleares derivadas da medula óssea, conseqüentemente de origem adulta (pluripotentes), essa fração de células mononucleares contém células precursoras hematopoiéticas de hemácias, plaquetas, linfócitos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos e em quantidade muito pequena as células da linhagem mesenquimal (0,01%) pluripotentes que, podem originar células dos tecido muscular, tecido ósseo, tecido adiposo, hepatócitos, condrócitos e também células do tecido nervoso (FIGURA 19).

Devido ao fato que as células-tronco derivadas da medula óssea, possuem essas propriedades, principalmente fatores antiinflamatórios e antinecrose celular, como os *neutrófilos*, segundo ALBERTS (2006) define: carboidratos da superfície de glóbulos brancos, que tem como função combater os processos inflamatórios teciduais. JUNQUEIRA (1990) afirma que, os *neutrófilos* constituem a primeira linha de defesa celular, sendo assim, a terapia celular nesta fase tem a possibilidade de otimizar os efeitos antiinflamatórios, antes do aparecimento dos mecanismos secundários descritos anteriormente.

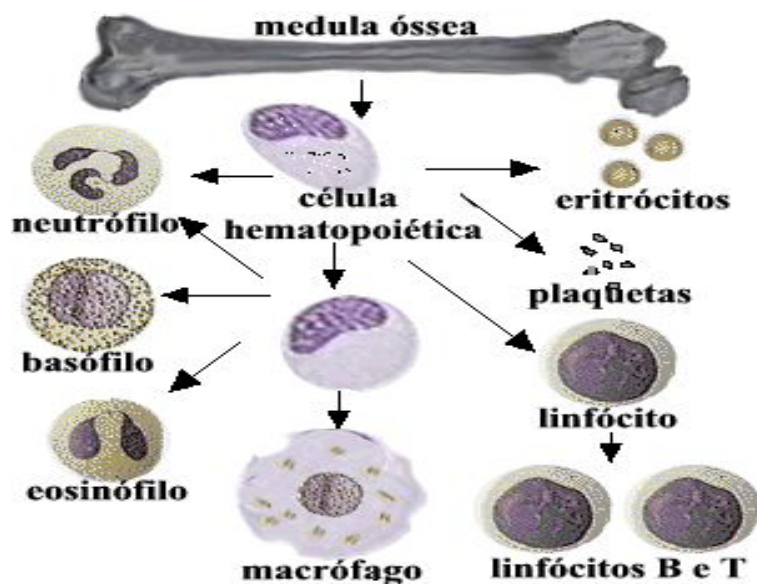
Segundo estudos realizados por LARSEN (2007); ZALDIVAR (2006); PEDERSEN (2005); FISCHER (2004); DIETRICH (2001); PEDERSEN (2001) e PEDERSEN (2000), mostraram que o exercício pode ser considerado como um tratamento antiinflamatório também, pode ser mediado pela *inter-leucina 6* derivada muscular (IL-6 muscular). Geralmente em infecções mais graves, o organismo gera um efeito cascata das citocinas contendo: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1ra, sTNF-R e IL-10. As duas primeiras citocinas têm características pró-inflamatória. No exercício a TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , não são participativas. Entretanto, o exercício físico estimula a produção das citocinas antiinflamatórias, primeiramente a IL-6, que estimula outras citocinas IL-1ra e IL-10. Sendo assim, o exercício físico também tem a possibilidade de reduzir o processo inflamatório desencadeado pelo TRM, evitando os efeitos dos mecanismos secundários.

Considerando os efeitos antiinflamatórios e antinecrose celular, tanto das células-tronco devidas da medular óssea, fração mononuclear, como do exercício físico, explica-se a evolução substancial na escala funcional (escala BBB), do

grupo que recebeu terapia celular e treinamento físico e comparação ao grupo controle, que não recebeu terapia celular e não recebeu treinamento físico ( $p=0,0000$ ).

Outra hipótese, porém menos provável, é que houve regeneração neuronal. Esta hipótese pode ser explicada, pela terapia celular e também pelo exercício físico. Na terapia com células-tronco derivadas da medula óssea, a fração mononuclear além da linhagem hematopoiética descrita anteriormente, contém também a linhagem mesenquimal (0,001- 0,01%) (STRAUER B.E., KORNOWSKI R., 2003). Tal linhagem tem maior capacidade de formar novos neurônios, porém sua expressão quantitativa é menor, mas esta pequena quantidade poderia se diferenciar no meio dependente, ou seja, em neurônio. Para aumentar a concentração dessas células e de seu potencial de diferenciação meio-dependente e conseqüentemente a eficiência, seria necessário um período de cultivo das células mesenquimais de 2 à 3 semanas para diferenciação celular *in vitro* (CHARMBERLAIN et.al, 2007).

Baseado nos estudos de SILVER (2004); BREGMAN e cols. (2002); COUMANS e cols. (2001) e BREGMAN e cols. (1997) que utilizaram além de células-tronco, fatores de crescimento neuronal chamado: *neurotrofina*. Tais trabalhos obtiveram resultados positivos, na regeneração axonal, aumento do potencial sináptico neuromuscular e na formação de novo neurônios. Na mesma linha de pensamento SMITH e cols. (2006); SEO e cols. (2006); DISHMAN e cols. (2006); VAYNMAN (2005); HUTCHINSON e cols. (2004) e DUPONT-VERSTEEGDEN e cols. (2000) mostraram que o exercício físico estimula a produção das *neurotrofinas*, moléculas protéicas capazes de induzir o crescimento das células neurais. Principalmente a do tipo neurotrofina-3 (NT-3) e o fator neurotrófico cerebral (BNDF), quando são estimuladas com exercícios físicos.



**FIGURA 19:** Linhagem Hematopoiética.  
(Fonte: curlygirl.naturlink.pt/tecidos)

#### 4.3. Discussão da concentração do lactato

Considerando os resultados obtidos na (TABELA 8), podemos afirmar que o exercício físico causou alterações metabólicas. Levando-se e conta que os tecidos metabolizam continuamente o lactato durante o exercício e esta eficiência pode ser aumentada com treinamento físico (WEINECK, 1999). Segundo MCARDLE (2003) a explicação subjacente ao efeito generalizado do treinamento físico aeróbico no sentido de reduzir os níveis de lactato sanguíneo baseia-se em três possibilidades: a) menor ritmo de formação de lactato durante o exercício; b) maior o ritmo de remoção do lactato durante o exercício e c) os efeitos anteriores combinados.

Os resultados mostram que o treinamento físico imposto aos animais alterou positivamente o quadro final em relação ao inicial. Podemos observar que o grupo *Treinado com célula* e o grupo *Treinado com meio* no momento (*final*), houve uma redução significativa da concentração de lactato em relação ao momento (*início*). Sugerindo que o exercício foi um fator interveniente no processo de reabilitação dos animais.

Os resultados referentes à comparação entre os dois grupos treinamento nos dois momentos, mostram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos. O que vem reforçar que ambos os grupos que passaram pelos 42 dias de treinamento, foram submetidos ao mesmo processo de exercícios físicos. Pois os dois grupos não apresentaram diferença significativa nos dois momentos.

#### **4.4. Discussão da Histopatologia**

A análise histopatológica, basicamente se limitou ao aspecto qualitativo.

Da análise histopatológica percebe-se que os achados demonstraram lesão intra-parenquimatosa no dorso de medula espinal (substância branca), todavia sem haver condições de discriminação de aspecto de regeneração neuronal.

A substância branca é composta por tratos neuronais, responsáveis pela conexão entre órgãos efetores/receptores e o córtex cerebral. Por estar situada externamente na medula espinal, é acometida de forma direta pelo trauma. No caso da lesão experimental, o trauma foi mais intenso na região posterior da estrutura medular. Na substância cinzenta, por estar localizada na região central da medula, sofreu menos com o impacto direto do trauma como foi demonstrado nas FIGURAS 13,14 e 15.

Baseado em estudos de VIALLE (2005); KURITA e cols. (2005) que utilizaram análise histopatológica quantitativa da medula espinal após o trauma, não se detectou diferença estatística para alterações decorrentes do evento traumático como: Hemorragia, necrose da substância branca, necrose da substância cinzenta e perda neural (acelularidade).

Do ponto de vista histopatológico neste trabalho não permite afirmar que o exercício físico associado com a terapia celular possui um efeito benéfico sobre a LMET. Visto que, não houve a distinção entre os grupos que funcionalmente apresentaram diferenças significativas. Porém do ponto de vista qualitativo, nota-se uma melhor integridade no aspecto morfológico da medula espinal demonstrado nas FIGURAS 16,17 e 18. Estas figuras representam imagens da

medula espinal de um dos animais que recebeu terapia celular e exercício físico combinados. Na FIGURA 17, nota-se um neurônio com sua estrutura aparentemente normal. Na FIGURA 18, nota-se a presença próxima ao neurônio dos astrócitos protoplasmáticos que tem como característica citoplasma abundante e granuloso. E são as maiores células da neuroglia. Suas principais funções são a sustentação e o isolamento, são os principais armazenadores de glicogênio do S.N.C. e controlam os níveis de potássio extraneuronal, captando íons a fim de auxiliar a manutenção de sua baixa concentração extracelular.

## 5. CONCLUSÃO

Com base no estudo realizado podemos concluir que após 48 dias do trauma da medula espinal:

- 1- Todos os grupos, do controle (sedentário com meio) ao experimental (Treinado com células), aumentaram seus escores na Escala Funcional (BBB). No entanto, o grupo que recebeu terapia celular com células derivadas da medula óssea: fração mononuclear e treinamento físico apresentou melhora estatística significativa da função motora em relação aos demais grupos. Sugerindo que, houve um efeito aditivo da terapia celular e do exercício físico.
- 2- O grupo *Treinado com células* (Tct) e o grupo *Treinado meio* (Tm) mostraram menor concentração de lactato sangüíneo no momento final após 42 dias de treinamento físico comparando ao momento início. Sugerindo que, houve alteração fisiológica influenciada pelo exercício físico.
- 3- A análise deste estudo histopatológico qualitativo, não permite afirmar seguramente que houve resultado benéfico com a terapia celular e estímulo do exercício físico para com a LMET. Porém podemos sugerir que o aspecto morfológico da medula espinal do animal que utilizou terapia celular e exercício físico é aparentemente mais íntegro em comparação com outros animais que não receberam terapia celular associado com exercício físico.
- 4- O exercício físico através da avaliação funcional (BBB), obteve resultados positivos auxiliado da terapia celular derivada da medula óssea. Sugerindo que, os dois tipos de intervenção são mais eficientes juntos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAGAARD, P. et. al. Neural adaptation to resistance training: changes in evoked V-wave and H-reflex responses. **J. Appl. Physiol.**, 92: 2309-2318, 2002.
2. ALBERTS, B. et. al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2006.
3. AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION. **Spinal cord injury statistics**. Disponível em: <<http://www.asia-spinalinjury.org/htm>> Acesso em 21 fev. 2008.
4. ANDERSON, D.K.; BRAUGHLER, J.M.; HALL, E.D. Effects of treatment with u-74006 on neurological outcome after experimental spinal cord injury. **J. Neurosurg**, 69:562-567, 1988.
5. BACKELANDT, V.; ARCKENS, L.; ANNAERT, W. Alterations in GAP-43 and synapsin immunoreactivity provide evidence for synaptic reorganization in adult cat dorsal lateral geniculate nucleus following retinal lesion. **Eur. J. Neurosci**. 6: 754-65. 1994.
6. BANNATYNE, B. A.; et. al. Differential projections of excitatory and inhibitory dorsal horn interneurons relaying information from group II muscle afferents in cat spinal cord. **The Journal Neuroscience**, 26(11): 2871-2880, 2006.
7. BARROS FILHO, T.E.; MOLINA, A.E. Analysis of the sensitivity and reproducibility of the Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) scale in wistar rats. **Clinics**., 63(1): 103-8, 2008.
8. BASSO, D.M.; BEATTIE, M.S.; BRESNAHAN, J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J. Neurotrauma**, 12: 1-21, 1995.
9. BASSO, D. M.; et al. Graded Histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. **Experimental Neurology**, 139: 244-256, 1996.
10. BASSO, D. M.; et al. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. **Brain**, 127: 1403-1414, 2004.

11. BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; et. al. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, 19(3): 180-92, 2001.
12. BLACK, P.; et al. Models of Spinal Cord Injury. **Neurosurgery**, 19:752-762, 1986.
13. BÖYÜM, A.; Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand J Clin Lab Invest**, 21 (suppl.): 77-89, 1968.
14. BRAUGHLER, J.M.; HALL, E.D. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. **J. Neurosurg**, 59: 256-261, 1983.
15. BREGMAN, B.S.; et. al. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rats. **Exp. Neurol.**, 148(2): 475-94, 1997.
16. BREGMAN, B.S.; et. al. Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. **Prog. Brain Res.** 137: 257-73, 2002.
17. BROOKS, G.A. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. **Med. Scie. Sports Exercise**, 7 (1): 22-31, 1985.
18. CAMPBELL, M.E.; HUGHSON, R.L.; GREEN, H.J. Continuous increase in blood lactate concentration during different ramp exercise protocols. **Journal Appl. Physiology**, 66 (3): 1104-1107, 1989.
19. CAO, Q.; et al. Stem cell repair of central nervous system injury. **Journal of Neuroscience Research**, 68: 501-510, 2002.
20. CHAMBERLAIN, G.; et. al. Concise Review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, 25: 2739-2749, 2007.
21. CONSTANTINI, S.; YOUNG, W. The effects of methylprednisolone and ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. **J Neurosurg**, 80: 97-111, 1994.



22. CONTARTEZE, R.V.L. Biomarcadores do estresse em ratos exercitados por natação e corrida em esteira rolante. **Dissertação de Mestrado, UNESP**, São Paulo, 2006.
23. CORTI, S.; et. al. Neural stem cells Lewis+CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. **Brain**, 130: 1289-1305, 2007.
24. COUMANS, J.V.; et. al. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. **J. Neurosci.**, 21(23): 9334-44, 2001.
25. CREWS, F.T.; NIXON, K.; WILKIE, M.E. Exercise reverse ethanol inhibition of neural stem cell proliferation. **Alcohol.**, 33(1): 63-71, 2004.
26. DEFINO, H.L.A. Trauma Raquimedular. **Medicina Ribeirão Preto**, 32; 388-400, 1999.
27. DENT, L.J.B. et. al. Attempts to facilitate dorsal column axonal regeneration in neonatal spinal environment. **J Compar Neurol**, 372: 435-456, 1996.
28. DIETRICH, W.D.; et. al. Neuoprotection and cellular transplantation after spinal cord injury. **Spring**, v.12:9-12, 2001.
29. DISHMAN, R.K.; et. al. Neurobiology of Exercise. **Obesity**, 14: 345-356, 2006.
30. DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E. et. al. Mechanisms leading to restoration of muscle size with exercise and transplantation after spinal cord injury. **Am. J. Physiol Cell Physiol**, 279: 1677-1684, 2000.
31. DUSS, P. **Diagnóstico Topográfico em Neurologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Cultural Médica, 1989.
32. ELBASIOUNY, S.M. and MUSHAHWAR, V.K. Modulation of motoneuronal firing behavior after spinal cord injury using intraspinal microstimulation current pulses: a modeling study. **J. Appl. Physiol.**, 103: 276-286, 2007.
33. ENGESSER-Cesar, C.; et al. Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury. **J. Neurotrauma**, jan; 22(1): 157-71, 2005.

34. FALCONER, J.C. et al. Characterization of an experimental spinal cord injury model using waveform and morphometric analysis. **Spine**, 21: 104-112, 1996.
35. FIELD-FOTE, E.C. Spinal Cord control of movement: Implications for locomotor rehabilitation following Spinal Cord Injury. **Physical Therapy**, 80: 5, 2000.
36. FILKENSTEIN, S.D. et. al. Expermental spinal cord injury: qualitative and quantitative histopathologic evaluation. **J. Neurotrauma**, 7: 29-40, 1990.
37. FISCHER, C.P. et. al. Endurance training reduces the contraction-induced interleukin-6 mRNA expression in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol Endocrinol Metab.** 287: 1189-1194, 2004.
38. FOX; FOSS, M.L.; KETHEYIAN, S.J. **Bases Fisiológicas do Exercício e do Esporte**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.q
39. GEBRIN, A. S.; et. al. Perspectivas de recuperação do lesado medular. **Rev. Bras. Ortop.**, 32(2): 103-108, 1997.
40. GOBATTO, C.A.; et al. Maximal lactate state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 130: 21-27, 2001.
41. GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
42. GWAK, Y.S.; et. al. Effect of age at time of spinal cord njury on behavioral outcomes in rat. **J. Neurotrauma**, 21(8): 983-93, 2004.
43. HARPER, J.M.; et. al. Axonal growth of embrionic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. **PNAS**, 101:7123-7128, 2004.
44. HARRI, M.; Kuusela, P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol. Scand.** 126, 189-197, 1986.
45. HAWKE, T.J. Muscle stem cells and exercise training. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, 33(2): 63-8, 2005.
46. HERMANN, A.; et. al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. **J Cell Sci**, 117: 4411-4422, 2004.
47. HOFSTETTER, C.P.; et. al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **PNAS**, 99: 2199-2204, 2002.

48. HUANG, W.L.; et. al. A combination of intravenous and dietary docosahexaenoic acid significantly improves outcome after spinal cord injury. **Brain: A Journal of Neurology**, 130(11): 3004-3019, 2007.
49. HULSEBOSH, C.E.; et. al. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. **Advances in Physiology Education**, 26: 238-255, 2002.
50. KESSLAK, J.P.; KEIRSTEAD, H.S. Assessment of behavior in animal models of spinal cord injury. **J. Spinal cord Med.**, 26(4): 323-8, 2003.
51. KOCSIS, J.D.; et al. Cell transplantation of peripheral-forming cells to repair the injured cord. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, 39(2): 287-298, 2002.
52. KURITA, N.; et al. An Evaluation of white matter after Spinal Cord Injury ischemia in rats: A Comparison with gray matter injury. **Anesth Analg**, 100: 847-54, 2005.
53. IPEA. **Impactos sociais e econômicos dos acidentes de trânsito nas aglomerações urbanas brasileiras**. Brasília, 2003.
54. KING, V. O.; et. al. Omega-3 fatty acids improve recovery, whereas Omega-6 fatty acids worsen outcome, after spinal cord injury in the adult rat. **The Journal of Neuroscience**, 26(17): 4672-4680, 2006.
55. KIRKENDALL, D.T.; GARRETT, W.E.; et al. **A Ciência do Exercício e dos Esportes**. Porto Alegre: Artmed, 2003.
56. KIRSCHSTEIN, R. Stem Cells: Scientific progress and future research. In: **The National Institute of Health**; 2001; Department of Health and Human Service; 2001.
57. KOCSIS, J.; et. al. Cell transplantation of peripheral myelin forming cells to repair the injured spinal cord. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, 39(2): 287-298, 2002.
58. KREGEL, K.C.; et. al. Resource Book for the Design of Animal. **American Physiological Society, Committee to develop an aps resource book for the design of animal exercise protocols**. Fev. 2006.

59. KUNKEL-BAGDEN, E.; DAI, H.N.; BREGMAN B.S. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. **Exp. Neurol.**, v. 119 (2): p. 153-64, 1993.
60. LARSEN, L.F.; et. al. Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle. **Experimental Physiology**, 92: 233-240, 2007.
61. LI, J.; et. al. Induction of functional recovery by co-transplantation of neural stem cells and Schwann cells in rat spinal cord contusion injury model. **Biomed. Environ.Sci.**, 20(3): 242-9, 2007.
62. MAIERON,M.; et. al. Function responses in the human spinal cord during willed motor actions: evidence for side and rate dependent activity. **The Journal of Neuroscience**, 27(15): 4182-4190, 2007
63. MANSILLA, A.; et. al. Bloodstream Cells Phenotypically identical to human Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells circulate in Large Amounts under the influence of Acute large skin damage: New evidence for their use in Regenerative medicine. **Transplantation Proceedings**, 38: 967-969, 2006.
64. MARTIN, J. H. **Neuroanatomia: Texto e Atlas**. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.
65. MCARDLE, W.D.; et. al. **Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003.
66. MCDONALD, J.W.; et. al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. **Nature Medicine**, 12: 1410-1412, 1999.
67. MELLONI, R.H.J.R.; et. al. Dynamics of synapsin I gene expression during the establishment and restoration of functional synapses in the rat hippocampus. **Neuroscience**, 58: 683-703, 1994.
68. METZ, G.A.S.; et. al. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. **J. Neurotrauma**, 17(1):1-17, 2000.

69. NAKAO, C.; et. al. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **J. Appl. Physiol.**,88: 649-654, 2000.
70. NATIONAL SPINAL CORD INJURY ASSOCIATION (NSCIA). Disponível em: <<http://www.spinalcord.org/htm>> Acesso em: 21 fev. 2008.
71. NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER (NSCISC). Spinal Cord Injury: Facts and Figures at a Glance. **Birmingham, AL: National Spinal Cord Injury Statistical Center**, 2003.
72. NERI, M.; et. al. Efficient in vitro labeling of human neural precursor cells with superparamagnetic iron oxide particles: Relevance for in vivo cell tracking. **Stem Cell**, 26: 505-516, 2008.
73. NOBLE, L.J.; WRATHALL, J.R. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. **Exp. Neurol**, 88: 135-149,1985.
74. OLIVEIRA, C.A.M.; ROGATTO, G.P.; LUCIANO E. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. **Rev. Brás. Méd. Esporte**, v.8(6): 219-24, 2002.
75. ONIFER, S.M.; RABCHEVSKY, A.G.; SCHEFF, S.W. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. **ILAR J.**,v.48(4): p. 385-95, 2007.
76. OZ, M.; et. al. Presynaptic angiotensin II AT1 receptors enhance inhibitory and excitatory synaptic neurotransmission to motoneurons and other ventral horn neurons in neonatal rat spinal cord. **J. Neurophysiol.**, 94: 1405-1412, 2005.
77. PARR, A.M.; KULBATSKI, I.; TATOR, C.H. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury. **J. Neurotrauma**, 24(5): 835-45, 2007.
78. PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ L. Exercise and the immune system: Regulation, Integration and Adaptation. **Physiological Reviews**, 80:3, 2000.
79. PEDERSEN, B.K.; et. al. Topical Review: Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. **Journal of Physiology**, 536: 329-337, 2001.

80. PEDERSEN, B.K.; PEDERSEN A.M.W. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol**, 98: 1154-1162, 2005.
81. PENG, L.; et. al. Human neural stem cells promote corticospinal axons regeneration and synapse reformation in injured spinal cord of rats. **Chinese Medical Journal**, 119(16): 1331-1338, 2006.
82. PINNINGTON, H.; DAWSON, B. Examination of the validity and reliability of the Accusport blood lactate analyser. **Journal of Science and Medicine in Sport**, vol 4(1): 129-138, 2001.
83. PITTENGER, M.; VANGURI, P.; SIMONETTI, D.; et. al. Adult mesenchymal stem cells: Potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. **J. Musculoskelet Neuronal Interact**, 2(4): 309-20, 2002.
84. REBUELTO, M.; et. al. Treatment time dependent difference of ketamine pharmacological response and toxicity in rats. **Chronobiol. Int.**, 19(5): 937-45, 2002.
85. REDE SARAH DE HOSPITAIS DE REABILITAÇÃO. Disponível em: <<http://www.Sarah.br/htm>> Acesso em: 21 fev. 2008.
86. REYNOLDS, T.H.; et. al. Transient enhancement of GLUT-4 levels in rat epitrochlearis muscle after exercise training. **J. Appl. Physiol.**, 88: 2240-2245, 2000.
87. ROUSSOS, I.; et. al. Development of a rat model of spinal cord injury and cellular transplantation. **Transplantation Proceedings**, 37: 4127-4130, 2005.
88. SCIVOLETTO, G.; et. al. Plasticity of spinal centers in spinal cord injury patients: New concepts for gait evaluation and training. **Neurorehabil. Neural Repair.**, 21: 358-365, 2007.
89. SEO, T.B.; et. al. Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. **Journal of the American College of Sports Medicine**, 38(7): 1267-1276, 2006.
90. SHIELDS, R.K. and DUDLEY-JAVOROSKI S. Musculoskeletal adaptations in chronic spinal cord injury: Effects of long-term soleus electrical stimulation training. **Neurohabil. Neural Repair**, 21:169-179, 2007.

91. SILVER, J. and MILLER, J. H. Regeneration beyond the glial scar. **Nature**, 5:146-156, 2004
92. SMITH, R.R.; et. al. Effects of swimming on funcional recovery after incomplete spinal cord injury in rats. **J. Neurotrauma**, 23(6): 908-19, 2006.
93. STRAUER, B.E.; KORNOWSKI, R. Stem cell therapy in perspective. **Circulation**, 107(7):929-34. 2003.
94. STRAUSS, D.; et. al. Economic factors and longevity in spinal cord injury: a reappraisal. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, 89(3): 572-4, 2008.
95. TERADA, S.; et. al. Effects of high-intensity swimming traning on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, 90: 2019-2024, 2001.
96. TESSLER, A.; et. al. Embryonic spinal cord transplants enhance locomotor performance in spinalized newborn rats. **Advances in Neurology**, 72: 291-303, 1997.
97. THOMPSON, R.B.; EMANI, S.M.; DAVIS, B.H.; et. al. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. **Circulation**, 108 Suppl 1:II264-71, 2003.
98. Vaynman, S. and Gomez-Pinilla F. License to run: Exercise impacts funcinal plasticity in the intact and central nervous system by using neurotrophins. **The American Society of Nurohabilitation**, 19:283-295, 2005.
99. VERFAILIE, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends of Cells Biology**. 12: 502-508, 2002.
100. VIALLE, E.; et. al. Avaliação de recuperação motora em ratos submetidos a lesão medular experimental. **Revista Brasileira de Ortopedia**. V. 37(3): p. 83-88, 2002.
101. VIALLE, E. **Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos**. Dissertação – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
102. VIALLE, L.R.G.; et. al. Estudos histológicos da lesão medular experimental em ratos. **Revista Brasileira Ortopedia** Rio de Janeiro, v. 34, p. 85-89, 1999.

103. VIALLE, L.R.G. **Instalação de um sistema de estudo de lesões medulares experimentais em animal.** Tese – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
104. WANG T.; XIE K.; LU B. Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. **J. Neurosci.** v. 15: p. 4796-805, 1995.
105. WEBBER, D.J.; et. al. Transplanted neural progenitor cells survive and differentiate but achieve limited functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. **Regen. Med.**, 2(6): 929-945, 2007.
106. WEINECK, J. **Treinamento Ideal.** 9 ed. São Paulo: Manole, 1999.
107. WRATHALL, J.R.; PETEGREW, R.K.; HARVEY, F. Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups. **Exp. Neurol.** v. 88: p. 108-122, 1985.
108. YALCIN, O.; et. al. Effects of swimming exercise on red blood cell rheology in trained and untrained rats. **J. Appl. Physiol.**, 88: 2074-2080, 2000.
109. YOUNG, W. Spinal Cord contusion models. **Prog. Brain Res.**, v. 137, p. 231-255, 2002.
110. ZALDIVAR, F. et. al. Constitutive pro and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. **J. Appl. Physiol.** v. 100; p. 1124-1133, 2006.



## ANEXO 1

**Avaliação funcional a cada 48 horas, dos 48 animais. Durante os 48 dias.**

Grupo Sedentário com meio (Sm)

B.B.B.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
1	6	0	5	4	2	6	0	2	1	7	7	0
2	6	0	3	4	2	6	0	2	1	7	7	1
3	6	3	4	3	2	7	2	2	1	7	7	2
4	6	5	6	4	5	7	5	6	2	11	9	2
5	6	5	7	6	4	8	7	6	4	11	12	4
6	6	5	7	7	4	8	7	7	5	11	14	5
7	6	6	7	7	4	8	6	7	6	12	14	7
8	6	8	8	8	4	8	7	7	6	14	14	6
9	6	7	8	8	4	8	6	10	8	14	14	7
10	7	9	8	8	5	8	6	10	8	14	16	8
11	6	8	10	9	5	8	6	11	10	15	15	8
12	6	7	13	11	6	8	6	11	8	14	15	9
13	7	7	14	12	6	8	6	11	9	15	16	9
14	7	8	14	12	6	9	6	11	9	15	17	9
15	7	8	14	12	6	8	6	11	9	15	18	9
16	7	9	16	12	6	9	7	12	10	14	18	9
17	7	8	16	12	6	8	8	13	11	14	18	9
18	7	9	16	13	6	8	8	13	10	14	18	9
19	7	9	16	13	6	8	7	12	11	14	18	9
20	7	9	16	13	6	9	6	13	11	14	18	11
21	7	10	18	13	6	9	7	12	11	14	18	12
22	7	11	17	12	6	10	7	12	11	14	18	12
23	7	11	17	12	7	10	7	12	11	14	18	11
24	7	11	17	12	7	10	7	12	11	14	18	11

Grupo Sedentário com células-tronco (Sct)

B.B.B.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
1	6	7	5	0	0	0	0	0	2	1	0	0
2	4	6	3	0	2	0	1	0	0	0	0	0
3	6	7	4	0	2	2	1	4	5	1	0	1
4	7	6	4	0	2	3	1	4	6	1	0	0
5	10	6	5	2	5	5	3	6	7	2	1	1
6	11	6	6	1	6	5	3	6	8	6	4	5
7	11	7	5	1	6	5	4	6	8	6	5	6
8	11	7	7	1	5	5	4	6	8	6	6	5
9	12	7	7	2	5	5	5	7	9	8	8	5
10	12	9	7	4	6	8	5	7	9	9	8	8
11	12	9	8	4	7	8	4	7	9	9	10	8
12	12	10	11	6	7	8	5	7	10	10	10	8
13	14	9	11	7	7	9	6	7	10	11	10	8
14	14	9	11	7	7	9	6	7	10	11	11	9
15	14	10	12	8	7	9	6	7	10	11	11	9
16	15	10	14	7	7	9	6	7	11	12	11	9
17	15	9	14	7	7	10	6	7	12	11	11	10
18	15	11	15	7	7	9	5	7	13	11	12	10
19	15	11	16	7	7	9	7	7	14	11	12	11
20	16	11	16	7	7	10	7	7	14	12	12	12
21	19	12	16	7	7	9	6	7	14	13	13	13
22	19	12	14	7	7	10	7	6	15	13	13	12
23	19	12	16	7	7	11	7	6	15	13	14	12
24	20	13	16	7	7	11	7	6	15	13	14	12

Grupo Treinado com meio (Tm)

B.B.B.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
1	0	0	4	6	0	0	2	1	6	1	4	0
2	1	0	5	6	2	0	2	1	6	1	4	1
3	5	1	3	6	2	1	5	1	7	3	4	1
4	7	2	5	7	4	1	7	2	7	6	6	3
5	9	4	6	7	4	2	7	3	9	9	8	4
6	10	5	7	8	5	3	7	3	11	9	8	6
7	11	5	8	13	5	4	7	4	12	9	8	6
8	11	5	8	13	5	4	7	4	12	n	8	6
9	13	6	8	15	5	6	8	5	14	11	8	7
10	14	6	9	14	6	7	8	6	14	11	10	8
11	14	7	9	14	8	8	9	7	15	11	10	8
12	14	8	14	16	8	8	9	7	15	11	12	9
13	15	8	14	17	8	8	9	8	15	12	12	9
14	14	8	12	17	8	8	9	10	15	13	12	9
15	15	8	13	19	8	9	9	10	15	13	13	9
16	15	8	13	20	8	10	10	11	15	12	13	10
17	15	8	14	20	8	11	9	11	15	12	13	11
18	15	8	14	20	9	12	10	12	15	12	13	11
19	15	8	13	20	9	12	11	12	15	12	13	11
20	14	8	13	20	9	13	12	13	15	12	13	12
21	16	9	12	20	9	12	12	13	15	13	14	12
22	16	8	14	20	9	12	12	13	15	13	14	12
23	16	9	14	20	9	12	12	13	15	13	14	12
24	16	9	14	20	9	12	12	13	15	13	14	12

Grupo Treinado com células-tronco (Tct)

B.B.B.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
1	1	0	0	0	0	6	2	3	6	1	0	1
2	1	1	0	1	1	6	2	3	3	1	0	1
3	0	5	3	1	2	6	2	4	6	1	0	1
4	2	6	4	5	3	6	6	6	7	1	0	6
5	5	7	6	5	4	7	6	6	8	3	2	9
6	5	7	7	7	3	8	7	7	11	6	4	10
7	6	7	8	7	3	10	7	7	11	6	4	11
8	7	10	7	8	4	11	7	9	11	6	5	12
9	8	12	9	8	4	12	8	9	13	7	6	13
10	8	12	11	8	5	13	8	11	14	7	7	13
11	11	12	13	9	6	13	9	12	14	8	7	15
12	11	13	15	11	6	15	11	12	15	8	8	16
13	12	14	15	11	8	15	11	12	16	8	8	16
14	13	14	15	11	8	16	12	14	16	8	8	17
15	14	14	15	12	8	16	12	14	16	8	8	18
16	14	15	16	12	9	18	13	16	16	8	9	16
17	14	15	16	12	9	19	13	16	16	9	9	17
18	14	16	17	12	10	19	14	18	17	10	10	18
19	14	16	19	14	10	19	14	18	18	10	10	18
20	14	17	19	14	11	20	15	19	18	11	10	18
21	15	17	18	14	11	20	15	19	18	11	11	18
22	17	19	19	15	10	20	16	20	19	13	11	19
23	17	19	19	17	11	20	16	20	19	14	12	19
24	19	19	19	17	11	20	16	20	19	14	13	19

## Anexo 2

### Protocolo de Treinamento Físico (natação) para os animais após LMET.

Seg.	Ter.	Qua.	Qui.	Sex.	Sáb.	Dom.
<b>Transplante celular</b>	X	10 min. adaptação	10 min. adaptação	10 min. adaptação	10 min. Lactato	X
60 min. 0%	60 min. 0%	60 min. 0%	60 min. 0%	60 min. 0%	60 min. 0%	X
60 min. 1%	60 min. 1%	60 min. 1%	60 min. 1%	60 min. 1%	60 min. 1%	X
60 min. 2%	60 min. 2%	60 min. 2%	60 min. 2%	60 min. 2%	60 min. 2%	X
60 min. 3%	60 min. 3%	60 min. 3%	60 min. 3%	60 min. 3%	60 min. 3%	X
60 min. 3%	60 min. 3%	60 min. 3%	60 min. 3%	60 min. 3%	60 min. 3%	X
60 min. 3%	60 min. 3%	10 min. Lactato	<b>Eutanásia</b>			

- (0%): 0% do peso corporal; (1%): 1% do peso corporal; (2%): 2% do peso corporal e (3%): 3% do peso corporal. Percentual de sobrecarga para o treinamento físico.
- (10 min. Lactato): Teste de 10 minutos para determinar a concentração de lactato.