

# PROJETO DE PESQUISA

“USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEDULA  
ÓSSEA NO TRATAMENTO DE PACIENTES LESADOS MEDULARES  
GRAVES (ASIA A) COM RESÍDUO DE FUNÇÃO ELETROFISIOLÓGICA”

ORIENTADOR: PROF. DR. GUILHERME ALVES LEPSKI

ANTONIO SANTOS DE ARAÚJO JÚNIOR

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SÃO PAULO

OUTUBRO DE 2014

## Introdução

Recentes avanços técnicos na área de biologia molecular trouxeram à tona discussões científicas, políticas e éticas a respeito das células-tronco. A capacidade regenerativa das células-tronco de diversos tecidos e seu papel recentemente descoberto nos diversos mecanismos de oncogênese abrem um novo horizonte de possibilidades terapêuticas.

Durante muito tempo, a medula espinhal era vista como um tubo que apenas ligava o cérebro com diferentes órgãos e estruturas do corpo humano. Esta visão simplificada mudou graças à contribuição brilhante de Sir Charles S. Sherrington, cuja famosa monografia, "The Integrative Action of the Nervous System" ("A Ação Integrada do Sistema Nervoso"), explicou como o Sistema Nervoso Central (SNC) é organizado. Com esta monografia, Sherrington resolveu o debate de longa data entre "Reticular Theory" ("Teoria Reticular", que argumentava que os neurônios são fisicamente contíguos) e a "Neuron Doctrine" (que sugeria que os neurônios se comunicam uns com os outros através de sinapses) (1). Outra forte crença na época era de que o SNC era incapaz de regenerar. Este ponto de vista foi desafiado quando Santiago Ramón y Cajal mostrou que as medulas espinhais transecionadas de animais eram capazes de se regenerar; no entanto, essa regeneração espontânea durava apenas cerca de 10 a 14 dias (2,3).

Saber como um sistema multicelular complexo pode se desenvolver a partir de uma única célula ou linhagem de células é um dos maiores desafios da biologia moderna <sup>1</sup>. O conceito das células-tronco foi inicialmente descrito na década de 60 para células hematopoiéticas, quando o transplante de um número limitado de células da medula óssea resultou na formação de colônias eritrocíticas no baço de camundongos previamente irradiados <sup>2,3</sup>.

Destes experimentos nasceu o conceito atual das células-tronco, as quais devem respeitar três propriedades para serem classificadas como células-tronco: a) capacidade de multiplicação própria; b) habilidade de produzir todos os tipos de células presentes em um determinado tecido; c) habilidade de se manter por um período de tempo significativo da vida do hospedeiro.

Animais vertebrados possuem vários tipos de células-tronco, alguns ativos apenas por curtos períodos da embriogênese, outros funcionantes por toda vida do organismo. A mais primitiva das células-tronco, chamada de célula-tronco totipotencial, é capaz de gerar qualquer tecido embrionário ou extra-embrionário de um organismo, como a célula do óvulo fertilizado. O produto da divisão celular do óvulo é o blastocisto.

O blastocisto tem uma camada externa de células do trofoblasto, que ajuda na nidação com o útero e na formação da placenta, e uma camada interna de 10-20 células pluripotentes que quando da implantação vão produzir todos os tecidos e órgãos do embrião em desenvolvimento. A célula pluripotente, também conhecida como célula-tronco embrionária, pode se diferenciar em qualquer célula do corpo com exceção do trofoblasto.

As células-tronco embrionárias (CTE) podem ser manipuladas *in vitro* para introduzir novos genes ou bloquear genes pré-existent no genoma dos animais de laboratório, como os camundongos “knock-out”, que têm genes específicos bloqueados por esta técnica.

As CTE de acordo com estímulos loco-regionais se diferenciam em células multipotentes da ectoderma, mesoderma e endoderma, as quais por sua vez vão resultar em células-tronco tissulares (mesenquimal, dérmica, sanguínea, etc) ou órgão-específicas, tais como as células-tronco neurais.

### *Células-tronco neurais*

As células-tronco neurais (CTN) apresentam uma organização hierárquica muito parecida com as células-tronco hematopoiéticas. À medida que as células multipotentes se proliferam e se renovam, as células progenitoras vão perdendo sua capacidade de se diferenciar em outras linhagens ou de se proliferar, ou seja, as células mais jovens têm uma capacidade menor de diferenciação.

As CTN podem se diferenciar em linhagens de neurônios, oligodendrócitos ou astrócitos. *In vitro* as CTN se dispõem em formações esféricas conhecidas como ‘neuroesferas’<sup>4</sup>. Poucas células oriundas da neuroesfera quando transferidas para o cérebro de roedores podem produzir neurônios e células da glia. No cérebro humano adulto, neuroesferas contendo CTN já foram isoladas da zona subventricular e do giro denteado do hipocampo<sup>5</sup>.

Uchida et al.<sup>6</sup> foram os primeiros a isolar CTN humanas separadas por técnica de imunofluorescência contra proteínas de membrana celular (p. ex. CD 133<sup>+</sup>, CD24<sup>neg/lo</sup>, CD45<sup>neg</sup>) da zona subventricular fetal. Estas células quando selecionadas *in vitro* puderam se replicar em cultura e gerar ‘neuroesferas’ capazes de se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Estas células também tiveram capacidade de se enxertar, migrar e se diferenciar quando transplantadas para cérebros de camundongos recém-nascidos imunocomprometidos<sup>7</sup>.

Estas células quando injetadas em camundongos portadores de lesão medular traumática puderam também melhorar a função motora<sup>8</sup>. Apesar do mecanismo desta melhora ser controverso, ele parece resultar da diferenciação das CTN em oligodendrócitos mielinizados sobre uma malha de linhagem astrocítica<sup>9,10</sup>.

No entanto o uso de enxerto heterólogo de CTNs em pesquisa com modelo animal necessita da aplicação concomitante de corticosteroides e de longos períodos de imunossupressão do hospedeiro. Conseqüentemente,

como solução, surgiram as pesquisas com células-tronco endógenas derivadas de células da medula óssea, principalmente células-tronco mesenquimais.

Até poucos anos havia número limitado de trabalhos em humanos, principalmente por questões éticas ligadas ao uso de células-tronco embrionárias, no entanto com o advento de células-tronco endógenas derivadas da medula óssea esse panorama está mudando, e de maneira drástica.

### *Lesão traumática medular em humanos*

No Brasil a incidência de traumatismo raqui-medular (TRM) é de 40 casos novos /ano/milhão de habitantes, ou seja, cerca de 6 a 8 mil casos novos por ano, sendo que destes 80% das vítimas são homens e 60% se encontram entre os 10 e 30 anos de idade <sup>11</sup>.

A severidade do TRM pode variar de completa paraplegia até mielopatia incompleta ou paraparesia. Além da severidade da lesão, o mecanismo de trauma é um dos fatores cruciais na escolha da modalidade terapêutica e na possibilidade de recuperação. O trauma inicial resulta em forças de estiramento e laceração do tecido nervoso, com interrupção da transmissão axonal, e posterior degeneração axonal e neuronal, com formação de cicatriz astrocítica <sup>12</sup>.

Em muitos casos de TRM, o algoritmo de tratamento envolve a descompressão medular com realinhamento espinhal e estabilização mecânica, a prevenção de isquemia e desmielinização pela cascata inflamatória, e finalmente a promoção da regeneração neural.

O primeiro relato da capacidade regenerativa da medula espinhal data de 1980 <sup>13</sup>, e desde então duas modalidades terapêuticas emergiram deste conhecimento, uma na tentativa de prevenir a cascata inflamatória (neuroproteção) e outra no intuito de induzir a remielinização e a regeneração axonal e neuronal (neuroregeneração).

A cascata inflamatória se inicia 1-2 dias após o trauma com a infiltração granulocítica, e em 5-7 dias com a infiltração macrófagica. Neste estágio os macrófagos ajudam na fagocitose de debris celulares e restos de mielina, e liberam fatores tróficos para CTNs endimárias endógenas, na tentativa de ativar a neuroregeneração. O pico da indução celular para diferenciação das CTN endimárias ocorre com 7 dias do trauma <sup>12</sup>.

No entanto após 3 semanas do trauma estes mesmos fatores estimulam a astrocitose reacional levando à formação de cicatriz astrocítica,

que por sua vez dificulta a neuroregeneração. Ou seja, o processo inflamatório exacerbado estimula a perda neuronal após o TRM, no entanto a inflamação controlada parece estimular a neuroregeneração <sup>12</sup>.

A ativação e promoção de CTN endógenas são de particular importância porque resultam em aproximadamente 500.000 – 2.000.000 de novas células no local da lesão após um mês do trauma <sup>12</sup>. Aparentemente a reativação deste processo pode ser conseguida com a implantação de células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas da medula óssea.

### *Aplicação de Células-tronco mesenquimais na neuroregeneração da lesão medular*

A injeção de CTM em modelos animais experimentais de TRM resultou em significativa preservação tissular, redução da cavidade siringomiélica e da cicatriz astrocítica, e melhora motora funcional <sup>14,15,16</sup>.

Em um ensaio clínico prospectivo de longa duração Park JH et al. <sup>17</sup> demonstrou melhora radiológica, eletrofisiológica e motora funcional nos pacientes com lesão traumática cervical completa, portadores de paraplegia ou tetraplegia, submetidos a injeção intramedular e intradural de CTMs derivadas da medula óssea.

Neste trabalho 10 pacientes portadores de lesão medular grave foram submetidos à punção da medula óssea do osso ilíaco para cultura de CTMs por 4 semanas. Após o que os pacientes foram submetidos a uma laminectomia sobre o local da cavidade siringomiélica, com abertura da duramater e injeção intramedular de 1 ml de solução salina contendo  $8 \times 10^6$  CTMs, e mais 5 ml com  $4 \times 10^7$  CTMs no espaço intradural. E após 4 semanas e 8 semanas os pacientes foram submetidos à punção lombar com injeção intratecal de mais 8 ml de solução salina contendo  $5 \times 10^7$  CTMs.

Como resultado 6 pacientes em 10 obtiveram melhora da força motora após um seguimento médio de 6 meses, e destes, 3 pacientes apresentaram melhora gradual das atividades de vida diária. Os mesmos 3 pacientes também apresentaram melhora radiológica mostrada pela Ressonância Magnética, com redução da cavidade siringomiélica e aumento da densidade e do diâmetro da medula espinhal. Estes pacientes ainda apresentaram melhora eletrofisiológica dos Potenciais Evocados Motores e Somato-sensitivos <sup>17</sup>. Nenhum evento adverso relacionado à aplicação de CTMs foi observado no período de estudo, tampouco foi observada degeneração maligna (Teratoma), como anteriormente relatada para células-tronco embrionárias.

## *Princípios da avaliação neurológica nos pacientes lesados medulares*

Após condutas primárias de atendimento ao paciente politraumatizado, aqueles pacientes suspeitos de lesão medular devem ser avaliados por profissional neurocirurgião, no intuito de se identificar a etiologia da lesão medular, os possíveis níveis de acometimento, a intensidade da lesão, o comprometimento sensoriomotor segundo exame neurológico detalhado e para que se possa proceder à solicitação de exames complementares à investigação.

Em seguida aos exames complementares, deve-se proceder à estratificação da lesão medular segundo a escala mundialmente aceita ASIA (American Spinal Injury Association)/ ISCoS (International Spinal Cord Society)<sup>18,19</sup>, e então avaliar possíveis indicações de tratamento cirúrgico ou necessidades de imobilização/ tração.

A classificação ASIA<sup>18</sup> é composta dos seguintes tópicos: a. avaliar o nível sensoriomotor da lesão baseado no teste de sensibilidade somatosensitiva consciente e no teste de motricidade volitiva; b. definir se a lesão medular é completa ou incompleta, segundo a perda completa ou preservação da função sensoriomotora sacral; c. definir o grau de intensidade da lesão (ASIA A, B, C, D ou E); d. estimar a zona de preservação parcial sensoriomotora naqueles doentes com lesão completa.

A definição neurológica para se classificar uma lesão medular como síndrome clínica completa ou incompleta foi inicialmente descrita por Guttmann em 1976<sup>20</sup>. A síndrome clínica completa seria aquela secundária a uma secção transversa total da medula espinhal, resultando na perda completa de sensibilidade e motricidade voluntária abaixo do nível da lesão<sup>20</sup>. Por sua vez a síndrome clínica incompleta seria advinda de lesão parcial da medula espinhal, com preservação de parte das funções sensorimotoras abaixo do nível da lesão. A lesão incompleta por sua vez pode ser dividida em dois subgrupos: a. lesão difusa acometendo todo um segmento medular, com lesão na substância cinzenta central e nos tratos longos ascendentes e descendentes da substância branca, no entanto de intensidade subtotal; b. lesão anatomicamente circunscrita de partes distintas da medula espinhal, com déficits dissociados dependentes do local danificado, por ex. síndrome cordonal anterior, central (Schneider), posterior ou síndrome de cone medular.

No entanto com o advento da avaliação neurofisiológica moderna, alguns pacientes anteriormente tidos como portadores de lesão medular completa tiveram comprovação neurofisiológica de influência supraespinhal sobre o potencial somatossensitivo, com a transmissão de sinal atravessando o sítio da lesão medular.

Por exemplo, quando estes pacientes submetidos à monitoração cutânea polieletroniográfica nos membros inferiores realizavam a manobra de Jendrassik ou faziam a flexão voluntária do pescoço, havia nitidamente um aumento na amplitude do potencial.

Esta resposta teria um substrato anatômico em estudos de necropsia, com a preservação de um pequeno número de axônios atravessando o sítio da lesão, que poderiam responder aos estímulos suprasedimentares<sup>21</sup>.

A essa síndrome subclínica incompleta (no entanto clinicamente completa), na qual estímulos suprasedimentares são capazes de alterar os reflexos profundos espinhais ou mesmo o potencial evocado somatossensitivo abaixo do nível da lesão medular, Kakulas e Dimitrijevic et al.<sup>22</sup> denominaram de “síndrome clínica discompleta”.

Estes então seriam os pacientes passíveis de tratamento neuroregenerativo da medula espinhal, tendo em vista atividade residual de controle suprasedimentar, ainda que subclínica!

#### *Crítérios de seleção de pacientes passíveis de tratamento com CTM*

Seriam passíveis de tratamento neuroregenerativo com CTM aqueles pacientes portadores de traumatismo raquimedular (TRM) cervical ou torácico, com síndrome clínica discompleta (com comprovação eletromiográfica de atividade residual suprasedimentar), com exames de imagem mostrando cavidade siringomiélica no nível de acometimento medular (sem a presença de cicatriz astrocítica e sem outros acometimentos ou compressões medulares residuais, comprovados por exame de ressonância magnética).

Alguns fatores de confundimento como a presença de TRM com síndrome clínica incompleta, e a presença de outros acometimentos da medula espinhal, serviriam como fatores de exclusão para o tratamento com CTM, tendo em vista a impossibilidade de se atribuir a melhora sensorimotora após o procedimento exclusivamente ao tratamento neuroregenerativo. Pacientes com lesão incompleta poderiam apresentar uma melhora sensorimotora apenas com tratamento fisioterápico ou mesmo pela história natural da doença como naqueles portadores de lesão centromedular. Pacientes com outras compressões raquianas poderiam se beneficiar apenas com o tratamento cirúrgico específico, falseando os possíveis resultados do tratamento neuroregenerativo.

Outrossim pacientes portadores de lesão medular completa absoluta, que preenchem todos os critérios clínicos e neurofisiológicos (com abolição total de motricidade voluntária ou sensibilidade abaixo do nível da lesão), com

evidência de silêncio eletromiográfico (sem sinal de influência supraespinhal ou mesmo influência consciente sobre os reflexos espinhais), devem também ser excluídos do tratamento neuroregenerativo com CTM.

## **Métodos**

Serão selecionados no período de estudo de Janeiro de 2015 à Dezembro de 2018 um total de **10 (dez)** pacientes portadores de lesão medular traumática grave (segundo classificação de ASIA diagnosticados como ASIA A) advindos do consultório particular dos envolvidos neste estudo ou do ambulatório de Neurocirurgia do HC-FMUSP.

Os pacientes devem se apresentar clinicamente com sequela motora e sensitiva definitiva há mais de 2 anos, com paraplegia e anestesia abaixo do nível da lesão, e devem obedecer aos seguintes critérios de inclusão.

### *Critérios de inclusão*

- a. Idade entre 18 e 35 anos;
- b. Pacientes portadores de lesão medular traumática secundária aos seguintes mecanismos de trauma: acidentes automobilísticos, queda de altura, mergulho em água rasa, ferimento por arma de fogo, acidentes durante prática de esportes radicais, lutas marciais e esportes de contato;
- c. Pacientes portadores de sequela motora grave abaixo do nível da lesão, com paraplegia há mais de 2 anos;
- d. Pacientes portadores de sequela sensitiva grave abaixo do nível da lesão (e nível sensitivo compatível), com anestesia termoalgésica e tátil há mais de 2 anos;
- e. Lesão medular irreversível em nível cervical baixo, transição cervicotorácica (C7-T1) ou torácica (T2-T12);
- f. Exame de Ressonância Magnética de Coluna datada até 3 (três) meses prévios à inclusão no estudo, com comprovação por laudo de Mielomalácia nos níveis descritos no item d;
- g. Exame de Ressonância Magnética da Coluna, datada até 3 (três) meses prévios à inclusão no estudo, sem evidência de compressões medulares;



- h. Exame de Rx de coluna comprovando bom posicionamento do material de síntese, naqueles pacientes submetidos à artrodese da coluna na fase aguda do traumatismo raquimedular;
- i. Presença de resíduo de função eletrofisiológica abaixo do nível da lesão, após estímulo suprassgmentar, documentado por Exame do Potencial Somatossensitivo e Motor (vide Monitorização Eletrofisiológica)
- j. Pacientes hígidos sem outras comorbidades, sem sinais de infecção, anemia, coagulopatia ou úlceras de pressão;
- k. Pacientes que se dispuserem a participar deste estudo por livre e espontânea vontade, e que assinem o termo de consentimento livre e esclarecido (vide Adendo 1) na presença testemunhal de seus familiares;

### *Monitorização Eletrofisiológica*

A monitorização eletrofisiológica consistirá na Monitorização do Potencial Evocado Somatossensitivo e Motor (PESM) na seleção dos pacientes do estudo e a cada 6 meses após a fase de tratamento com as células-tronco.

A monitoração ficará ao encargo do colega eletrofisiologista Dr. Ricardo Ferreira e será realizada no Centro Cirúrgico Ambulatorial do Instituto de Psiquiatria do Hospital da Clínicas HC-FMUSP (IPq-HC).

Os pacientes serão submetidos à sedação endovenosa pela Equipe de Anestesiologia do IPq-HC sem o uso de agentes relaxantes, e então monitorizados com o uso de eletrodos de superfície em membros inferiores para polieletroniografia e eletrodos em couro cabeludo para estímulo motor com 400V;

Durante a realização do exame e sob efeito de analgesia completa estes pacientes são então acordados e solicitados para desempenhar os seguintes estímulos suprassgmentares: a. Manobra de Jendrassik (o paciente è solicitado à cerrar os dentes e realizar a preensão forçada dos dedos de uma das mãos contra os dedos da outra), b. Flexão voluntária cervical até encostar o queixo contra o peito.

Se durante a realização destas manobras estes pacientes apresentarem alteração eletrofisiológica eletromiográfica abaixo do nível da lesão, isto comprova o resíduo de função suprassgmentar que atravessa o

nível medular acometido, ou seja diagnóstica estes pacientes como portadores de Síndrome Medular Discompleta!

Estes pacientes são então passíveis de tratamento neuroregenerativo e, quando obedecidos todos os outros critérios de inclusão, são então selecionados para o estudo.

#### *Coleta da Medula Óssea do osso ilíaco, seleção das Células-tronco Mesenquimais e cultivo das células*

A coleta da medula óssea, a seleção das células-tronco mononucleares mesenquimais e sua cultura em meio próprio ficará ao encargo do colega Hematologista Dr Celso Massumoto e ao Grupo de Células-tronco do Centro de Criogenia Brasil – CCB, sob a coordenação da Dra Sally Massumoto. A coleta, armazenamento e cultura das células-tronco seguem um rigoroso protocolo internacional a seguir descrito.

#### *Preparo e cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea do osso ilíaco*<sup>23-25</sup>

Em centro cirúrgico são coletados cerca de 200 ml de medula óssea extraída da crista ilíaca do paciente segundo protocolo estabelecido por Thomas *et al.*, 1975.

O paciente deve concordar em participar do estudo de livre e espontânea vontade, bem como assinar um termo de consentimento informado. Após a coleta, o material é submetido à separação das células mononucleares através do gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) segundo Ahmadbeigi, *et al.* 2012, sendo em seguida lavado com solução fisiológica e centrifugado a 500 G por 5 minutos.

As células mononucleares ( $\sim 10^6$ ) são plaqueadas em frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Inc., Corning, NY, USA) e cultivadas segundo Lizier, *et al.*, 2012 em meio Dulbecco's-modified Eagle's medium (DMEM) /Ham's F12 (DMEM/F12, Invitrogen Corporation - Carlsbad, CA, USA) suplementado com 15% soro fetal bovino (SFB, Hyclone, Logan, Utah, USA), 100 units/ml penicilina, 100 µg/ml streptomina, 2 mM L-glutamina, e 2 mM aminoácido não essenciais (todos da Invitrogen) em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> (estufa incubadora - Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Após um período de 3 a 7 dias, células fibroblastóides começam a aparecer. Estas células crescem em monocamada e posteriormente são lavadas duas vezes com solução fosfato-tamponada (PBS - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e

submetidas à dissociação enzimática com Tryple (Invitrogen) por 3 a 6 minutos a 37°C.

A passagem 1 é contada após a primeira dissociação enzimática. A ação da Tryple é inativada por meio de cultura suplementado com 10% SFB e as células ( $\sim 5 \times 10^5$ ) são plaqueadas em frascos de cultivo 75 cm<sup>2</sup> (Corning). Este protocolo de subcultivo é realizado a cada 7 a 14 dias e o meio de cultivo é trocado a cada 3 a 4 dias. Para a criopreservação, 90% plasmim (Halex Istar, Goiania, GO, Brasil) e 10% dimethylsulfoxido (DMSO) (OriGen Biomedical, Austin, TX, USA) são utilizados como meio criopreservante. As células criopreservadas são mantidas em batoques (Corning) a -196°C.

#### *Imunofenotipagem das Células-tronco Mesenquimais derivadas da Medula Óssea*

A imunofenotipagem é baseada em citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos contra proteínas humanas conjugados com FITC, como CD90 (marcador mesenquimal) e CD34 (marcador hematopoiético) e seu respectivo isotipo controle (todos da BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA).

As células na passagem três são dissociadas por tratamento enzimático (6 min a 37°C com Tryple), centrifugadas (10 min a 400 g) e lavadas com PBS a 4°C. A seguir as células na concentração de  $10^5$  células/ml são incubadas com os anticorpos acima mencionas (1 µl). Após 45 minutos de incubação protegido da luz e em temperatura ambiente, as células são lavadas três vezes com PBS e ressuspendidas em 0,25 ml de PBS gelado. A análise é realizada utilizando um *fluorescence-activated cell sorter* (FACSCantoll; Becton, Dickinson, San Jose, CA) utilizando o programa *CELL Quest* (Becton, Dickinson).

#### *Controle de Crescimento Microbiológico na Cultura das Células-tronco Mesenquimais derivadas da Medula Óssea*

Para este procedimento são retirados cerca de 2 ml de meio condicionado dos frascos de cultura das células-tronco mesenquimais sendo posteriormente adicionados à garrafa de crescimento microbiológico (BD Bactec Peds Plus<sup>TM</sup>). Este controle detecta o crescimento de microrganismo aeróbio e anaeróbio em amostras de meio após cerca de cinco dias, pois contêm resinas inibidoras de antibióticos (meios PLUS).

### *Tratamento cirúrgico e aplicação das Células-tronco*

Após a cultura das células-tronco por 4 semanas, e confirmação da viabilidade numérica e microbiológica das células, os pacientes são submetidos ao tratamento cirúrgico para aplicação intramedular das células no segmento acometido sob visualização microscópica direta, e seguindo o protocolo publicado por Park et al<sup>17</sup>.

Estes pacientes serão operados no Centro Cirúrgico do IPq, sob anestesia geral venosa total, posicionados ventralmente em mesa cirúrgica, e submetidos à laminectomia de um nível (do nível acometido com mielomálica mostrado por exame de Ressonância Magnética prévia) guiada por radioescopia intraoperatória.

Após a visualização da dura-máter, e sob magnificação de microscópio cirúrgico, é realizada a inspeção do espaço subaracnóide e da medula com o uso de Ultrassom intraoperatório, e então se procede à aplicação guiada pelo ultrassom de 1ml de solução contendo  $8 \times 10^6$  de CTM intramedular com o uso de Seringa especial de microinfusão (seringa e agulha de Hamilton – Nevada/USA), e de 5 ml de solução contendo  $40 \times 10^6$  de CTM no espaço intradural subaracnóide. As agulhas empregadas para infusão são de uso único e esterilizadas por autoclavagem (agulha ultrafina de microinfusão do tipo Hamilton F281134), assim como as seringas também de uso único próprias para microinfusão.

Após 4 semanas e 8 semanas da aplicação cirúrgica das células (e segundo protocolo de Park et al<sup>17</sup>), os pacientes são submetidos à punção lombar L1-L2 em posição de decúbito lateral, com uso de agulha descartável de raquianestesia (BD-Spinal numero 10), para infusão intratecal de 8ml de solução contendo  $50 \times 10^6$  de CTM.

### *Seguimento clínico, eletrofisiológico e radiológico*

Após a avaliação neurológica inicial segundo documentação da American Spinal Injury Association – ASIA, com exame neurológico completo, os pacientes serão submetidos a exames neurológicos periódicos a cada 3 meses. Todos os testes neurológicos, desde exames da motricidade, sensibilidade, reflexos superficiais e profundos serão filmados para posterior análise independente.

O seguimento eletrofisiológico será realizado por exame do potencial evocado somatossensitivo e motor (PESM) na seleção dos pacientes e a cada 6 meses após o tratamento com as CTM. Os parâmetros do PESM a

serem analisados e plotados serão as amplitudes das ondas dos potenciais motores com estímulo de 400V e estratificados em 2mA e 5mA nos seguintes regimentos musculares: paravertebral (T1-L1), lilio-psoas (L2), quadriceps (L3), tibial (L4-L5) e sacral (S1-S2).

O seguimento radiológico consiste na realização de exame de Ressonância Magnética de Coluna Cervico-torácica a cada 6 meses após o tratamento com CTM. Os parâmetros a serem analisados pela RM serão o diâmetro antero-posterior da medula acometida (local da aplicação intramedular de CTM), e da extensão da mielomalácia e/ou siringomielia traumática.

#### *Banco de dados e Análise estatística*

Os dados coletados serão armazenados em software Microsoft Office Excel Mac 2014, e a análise estatística será realizada com o uso do SPSS 22.0 - Softonic. A análise estatística a ser empregada será o teste-t pareado por paciente, pré-CTM vs pós-CTM, com os múltiplos parâmetros clínicos, eletrofisiológicos e radiológicos.

As variáveis quantitativas de parâmetros clínicos a ser analisadas serão: a. o grau de força motora, proximal e distal das pernas; o grau de sensibilidade termoalgésica e tátil, no diversos dermatomos analisados (documentados segundo protocolo ASIA). As variáveis qualitativas clínicas a ser analisadas serão baseadas nos filmes do exame neurológico pré-CTM e pós-CTM dos pacientes do estudo e de mais dez pacientes paraplégicos não submetidos ao tratamento neuroregenerativo. Estes filmes serão assistidos por colega neurologista único independente, e os parâmetros considerados serão: a. melhora; b. igual; c. piora; com relação aos exames pré-CTM vs pós-CTM.

As variáveis quantitativas a ser analisadas para os parâmetros eletrofisiológicos serão as amplitudes das ondas dos potenciais motores com estímulo de 400V, nos diversos grupamentos musculares, pré-CTM vs pós-CTM em 6 meses, 1 ano, 18 meses e dois anos.

As variáveis quantitativas radiológicas a ser analisadas serão o diâmetro antero-posterior da medula acometida pré-CTM e pós-CTM, e ainda a extensão da mielomalácia medida em milímetros pré-CTM vs pós-CTM.

O tratamento dos dados estatísticos será realizada por equipe especializada terceirizada e o nível para significância estatística esperado será de 0,05.

## **Bibliografia**

1. Burke RE. Sir Charles Sherrington's the integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. *Brain* 2007;130:887-894.
2. Puchala E, Windle WF. The possibility of structural and functional restitution after spinal cord injury. A review. *Exp Neurol* 1977;55:1-42
3. Mariano ED, Batista CM, Barbosa BJ, Marie SK, Teixeira MJ, Morgalla M, Tatagiba M, Li J, Lepski G. Current perspectives in stem cell therapy for spinal cord repair in humans: a review of work from the past 10 years. *Arq Neuropsiquiatr*. 2014 Jun;72(6):451-6.
4. Cheshier SH, Kalani MY, Lim M, Ailles L, Huhn SL, Weissman IL. A neurosurgeon's guide to stem cells, cancer stem cells, and brain tumor stem cells. *Neurosurgery* 65:237-250, 2009.
5. Wu AM, Siminovitch L, Till JE, McCulloch EA. Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture, *Proc Natl Acad Sci USA* 59:1209-1215, 1968.
6. Wu AM, Siminovitch L, Till JE, McCulloch EA. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J Cell Physiol* 69:177-184, 1967.
7. Anderson DJ. Stem cells and pattern formation in the nervous system: The possible versus the actual. *Neuron* 30:19-35, 2001.
8. Doetsch E, Petreanu I, Caill I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034, 2002.
9. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14720-14725, 2000.
10. Tanaki S, Eckert K, He D, Sutton R, Doshe M, Jain G, Tushinski R, Reitsma M, Harris B, Tsukamoto A, Gage F, Weissman I, Uchida N. Engraftment of sorted/ expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res* 69:976-986, 2002.
11. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, Gage FH, Anderson AJ. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14069-14074, 2005.
12. Cao QL, Zhang YP, Howard RM, Walters WM, Tsoufas P, Whittemore SR. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol* 167:48-58, 2001.
13. Rosenbluth J, Schiff R, Liang WL, Menna G, Young W. Xenotransplantation of transgenic oligodendrocytes-lineage cells into spinal cord-injured adult rats. *Exp Neurol* 147:172-182, 1997.

14. D'Andrea Greve J. Traumatismos raquimedulares nos acidentes de trânsito e uso de equipamentos de segurança. *Diag & Tratam* 2(3):10-3, 1997.
15. Bambakidis NC, Butler J, Horn EM, Wang X, Preul MC, Theodore N, Spetzler RF, Sonntag VKH. Stem cell biology and its therapeutic applications in the setting of spinal cord injury. *Neurosurg. Focus* 24:E19, 2008.
16. Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 284:264-265, 1980.
17. Osaka M, Hommou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res* 1343:226-235, 2010.
18. Neuhuber B, Timothy Himes B, Shumsky JS, Gallo G, Fischer I. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Res* 1035(1):73-85, 2005.
19. Zurita M, Vaquero J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett* 402(1-2):51-56, 2006.
20. Park JH, Kim DY, Sung IY, Choi GH, Jeon MH, Kim KK, Jeon SR. Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery* 70(5):1238-47, 2012.
21. American Spinal Injury Association. International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury, rev. 2002. Chicago, IL: American Spinal Injury Association, 2002.
22. Steeves JD, Lammertse D, Curt A, Fawcett JW, Tuszynski MH, Ditunno JF et al. "Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury (SCI) as developed by the ICCP panel: Clinical trial outcome measures." *Spinal cord* 45 (2007):206-221.
23. Guttman L. "Symptomatology". In *Spinal Cord Injuries: Comprehensive Management and Research*, edited by L. Guttman, 260-279. London: Oxford University Press, 1976.
24. Kakulas BA. "A review of the neuropathology of human spinal cord injury with emphasis on special features". *J Spinal Cord Medicine* 22(1999):119-124.
25. Kakulas BA, Dimitrijevic MR, Tansey K. Neurophysiological principles for the assessment of residual motor control below the spinal cord injury in humans. In *Restorative neurology of spinal cord injury*, edited by Milan R. Dimitrijevic, 10-42. London: Oxford University Press, 2012.
26. Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1975 Apr 17;292(16):832-43.

27. Ahmadbeigi N, Soleimani M, Babaeijandaghi F, Mortazavi Y, Gheisari Y, Vasei M, Azadmanesh K, Rostami S, Shafiee A, Nardi NB. The aggregate nature of human mesenchymal stromal cells in native bone marrow. *Cytotherapy*. 2012 Sep;14(8):917-24.
28. Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, Kerkis I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One*. 2012;7(6):e39885.