UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JÉSSICA RODRIGUES ORLANDIN

**Tratamento de doença de disco intervertebral crônica em cães
utilizando células-tronco derivadas da membrana amniótica**

Pirassununga
2018

JÉSSICA RODRIGUES ORLANDIN

**Tratamento de doença de disco intervertebral crônica em cães
utilizando células-tronco derivadas da membrana amniótica**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociências Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

071t Orlandin, Jéssica Rodrigues
Tratamento de doença de disco intervertebral
crônica em cães utilizando células- tronco derivadas
da membrana amniótica / Jéssica Rodrigues Orlandin ;
orientador Carlos Eduardo Ambrósio. -- Pirassununga,
2018.
55 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Terapia celular. 2. Lesão Medular. 3.
Discopatia. 4. Células-tronco fetais. I. Ambrósio,
Carlos Eduardo, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: ORLANDIN, Jéssica Rodrigues

Título: Tratamento de doença de disco intervertebral crônica em cães utilizando células-tronco derivadas da membrana amniótica

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data de aprovação: 11/02/2018

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a): Carlos Eduardo Ambrósio

Instituição: FZEA

Julgamento: Aprovado

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a): Silvio Henrique Freitas

Instituição: FZEA

Julgamento: Aprovado

Prof.(a) Dr.(a): Luiz Henrique Lima Mattos

Instituição: Instituto Bioethicus

Julgamento: Aprovado

Prof.(a) Dr.(a): Matheus Levi Tajra Feitosa

Instituição: UEMA

Julgamento: Aprovado

COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA (C.E.P. – FZEA): 14.1.1465.74.6

CEUA Nº: 2274160216

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Daniel Henrique Orlandin e Sandra Rodrigues Orlandin, por todo o esforço para me proporcionar as oportunidades que tive, desde o início da minha vida. A toda a minha família, por acreditarem no meu potencial e no meu trabalho, principalmente à minha avó Valquiria Patriota por todo apoio na nossa educação.

À minha cadelinha, Pakita, ao meu filhote felino, Petit, e a todos os animaizinhos que de alguma forma foram utilizados como cobaia na minha formação. À Priscila e ao Pupim, que também são responsáveis por eu estar aqui.

Ao Dr. Zampieri, Dr. Caporrino, Dr. Segretto e enfermeiros do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, por me permitirem estar hoje realizando um sonho.

Ao publicitário Felipe Godinho Page, pelo fantástico trabalho com o logo do projeto e o material para divulgação.

Aos meus amigos Karolyne Silveira, Isabel Esteves, Victor Augusto Aguiar, José Luiz Barbalho, Charles Silva, que mesmo distantes, conseguiram estar tão presentes em minha vida. Ao Jaiber Rodriguez, Shamira Sallum, Victor Kazuo, Willian Ribeiro, Victor Martins e Vitória Pereira pela amizade e apoio durante o projeto. Aos queridos amigos gaúchos João Pedro Pfeifer e Marina Ferrasso, que sempre me receberam de braços abertos em Botucatu!

A todos responsáveis pela minha formação, principalmente aos professores e funcionários da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.

Aos Doutores César Prado, Matheus Feitosa, Renato Bocabello e Gisele Greggi pelas sugestões durante a elaboração e execução do projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, por ter feito não só o papel de orientador, mas também de amigo e pai! À Natalia Gonçalves, Vanessa Oliveira, Valéria Carregaro, Alessandra Pinheiro, Kelly Roballo, Atanásio Vidane, Janine

França, Fábio Cury, Luciana Machado, Vitória Pereira, Daniele Martins, alunos de iniciação científica e agregados da Equipe GDTI pelo convívio e apoio diário. Faço aqui um agradecimento especial à minha grande companheira de bancada, e agora Mestre, a qual sem ela não seria possível concluir este trabalho, Ingrid Gomes e à Dra. Juliana Barbosa Casals que, além de proporcionar o material imprescindível para o experimento, esteve presente como amiga para ajudar em qualquer situação!

Aos meus “estagiários”, Bruna Urbano, Shamira Sallum, Artur Fuertes, Mayra Hirakawa e Ana Luiza Orlandin, pela ajuda imensurável para esse projeto!

Ao Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro e toda a equipe do Núcleo de Anestesiologia Veterinária (NAVE-FZEA) pelos procedimentos anestésicos e atenção especial com os cãezinhos. E ao Alois Müller e ao Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas, pelos ensinamentos durante o PAE e os procedimentos cirúrgicos.

Aos professores, funcionários e pós-graduandos da Unesp de Botucatu, especialmente à Prof^a. Dr^a. Vânia Maria de Vasconcelos Machado, Heraldo André Catalan Rosa, Maria Cristina Reis Castiglioni, Prof. Dr. Francisco José Teixeira Neto, Carolina Hagy Giroto, equipe de anestesia, Ivânio Teixeira de Borba Júnior, Prof^a. Dr^a. Ana Liz Garcia Alves e orientados, por toda a paciência e apoio.

À Capes, pelo apoio financeiro, e à FAPESP, por prover o equipamento de ressonância magnética, através do Processo 2009/54028-8. À empresa LL Pet, pela parceria e por fornecer os petiscos para o projeto.

À banca de defesa de qualificação e dissertação pelas considerações e críticas construtivas que acrescentaram muito ao trabalho e a mim.

Aos tutores, por todo o carinho e compreensão, e aos cãezinhos selecionados para o projeto, por me mostrarem que quando se envolve amor, a ciência vai muito além de dados estatísticos!

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, meu muito obrigada!

“A distância entre o sonho e a realidade chama-se disciplina.”

- Bernardinho

RESUMO

ORLANDIN, J.R. **Tratamento de doença de disco intervertebral crônica em cães utilizando células-tronco derivadas da membrana amniótica.** 55 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

As doenças de disco intervertebrais (DDIV) representam a maior parte de atendimentos neurológicos e são responsáveis pela maioria dos casos de paralisia em cães. Os tratamentos utilizados atualmente não demonstram resultados satisfatórios em pacientes com manifestações neurológicas mais graves. A fim de promover recuperação nervosa e motora, além de melhora na qualidade de vida, o presente trabalho objetivou criar um protocolo, através de um ensaio duplo cego, associando cirurgia descompressiva e transplante alogênico de células-tronco (CT) derivadas da membrana amniótica em cães com DDIV crônica. As mesmas células já foram caracterizadas anteriormente como mesenquimais fetais e apresentaram-se seguras para aplicação. Foram selecionados oito cães, onde quatro já passaram por cirurgia e receberam três aplicações epidurais de células-tronco. Os outros quatro animais foram submetidos à cirurgia descompressiva e divididos aleatoriamente (teste duplo cego) em dois grupos: “cirurgia + placebo”, o qual recebeu apenas solução fisiológica; e “cirurgia + CT”, que recebeu a terapia celular. Durante o procedimento cirúrgico, foi realizado a aplicação por gotejamento sobre a lesão, e após quinze e quarenta e cinco dias foram realizadas outras duas aplicações, via epidural. Os animais passaram por acompanhamento quinzenal e foram reavaliados três meses após o procedimento cirúrgico, através de exames funcionais e ressonância magnética. Alguns animais apresentaram melhora neurológica significativa, como a recuperação da nocicepção e capacidade de se manter em estação. Apesar da necessidade de mais estudos, até o presente momento, a terapia celular apresentou-se factível e sem efeitos prejudiciais aos animais.

Palavras-chave: *terapia celular, lesão medular, discopatia, âmnio.*

ABSTRACT

ORLANDIN, J.R. **Treatment of chronic intervertebral disc diseases in dogs using amniotic membrane-derived stem cells.** 55 f. M.Sc. Dissertation – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo. Pirassununga, 2018.

Intervertebral disc (IVD) diseases represent the majority of neurological attendance and are responsible for the most cases of paralysis in dogs. Treatments currently used do not show satisfactory results in patients with more severe neurological manifestations. In order to promote nerve and motor recovery, as well as improve quality of life, the present study aims to create a protocol, using double-blind test method, associating spinal decompression surgery and allogeneic transplantation of amniotic membrane-derived stem cells (AMSCs) in dogs with chronic IVD diseases. Those were previously characterized as fetal mesenchymal cells and were safe for application. Eight dogs were selected, where four have already gone through surgery and received 3 epidural applications of stem cells. The other four animals were submitted to spinal decompression surgery and randomly divided into two groups (double blind test): “surgery + placebo”, which received only physiological solution; and “surgery + AMSCs”, which receive cell therapy. During the surgical procedure, a drip application was performed on the lesion and after fifteen and forty five days another two applications were made via epidural. Animals were monitored biweekly and were reassessed three months after surgery, by functional tests and magnetic resonance exams. Some animals presented significant neurological improvement, such as the recovery of nociception and ability to remain on station. Despite the need further studies, until the present moment, cell therapy has been feasible and has no harmful effects on animals.

Key-words: *cell therapy, spinal cord injury, discopathy, amnion.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Material de divulgação impresso.	22
Figura 2. Avaliação de nocicepção sendo realizada em um dos animais selecionados.	24
Figura 3. Sala de Ressonância Magnética (A) e animal posicionado durante exame (B).	26
Figura 4. Colocação de cateter epidural (A) e aplicação de células-tronco (B).	27
Figura 5. Confirmação de espaço lombossacral através do teste de gota pendente (A). Aplicação epidural solução (B).	28
Figura 6. Exposição das raízes nervosas durante procedimento de hemilaminectomia.	29
Figura 7. Feto em terço final gestacional, envolto pela membrana amniótica.	30
Figura 8. Células-tronco derivadas da membrana amniótica com cerca de 90% de confluência, com características mesenquimais "like".	30
Figura 9. Transfusão de sangue sendo realizada em paciente após hemorragia durante hemilaminectomia.	32
Figura 10. Um dos animais do "grupo cirurgia + CT", em estação.	34
Figura 11. Ressonância magnética evidenciando área de sinal hipointenso e degeneração discal nos cortes sagital (A) e transversal (B).	36
Figura 12. Ressonância Magnética pós-operatória, evidenciando artefato de imagem.	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Avaliação do "grupo CT"	33
Gráfico 2. Avaliação do "grupo cirurgia + CT"	34
Gráfico 3. Avaliação do "grupo cirurgia + placebo"	35

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Delineamento experimental.	23
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação funcional pela Escala de Olby.	25
Tabela 2. Animais que concluíram o projeto.	31

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - por cento

µL – microlitros

µm - micrometros

app – aplicação

CO₂ – dióxido de carbono

DDIV – Doença de discos intervertebrais

DMEM – Dulbelcco's Modified Eagle's Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

EV - Endovenoso

g – G Force

IDV – Intervertebral disk disease

LCR – Líquido cefalorraquidiano

mL – mililitros

°C – Graus Celsius

PBS – Tampão fosfato-salino

SFB – Soro Fetal Bovino

U/mL – Unidade Internacional por mililitros

αMEM – Minimum Essential Medium Eagle – Alpha Modification

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA.....	15
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
4.1 Lesão Medular em cães	16
4.2 Células-tronco derivadas da membrana amniótica	18
4.3 Terapia celular na lesão medular	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5.1 Comitê de Ética	20
5.2 Isolamento e cultivo celular	20
5.3 Criação do banco de células	21
5.4 Ensaio pré-clínico.....	22
5.4.1 Divulgação do projeto e seleção dos animais	22
5.4.2 Delineamento experimental	22
5.4.3 Avaliação funcional e neurológica.....	24
5.4.4 Exames de ressonância magnética	25
5.4.5 Preparo das células-tronco e terapia celular	26
5.4.6 Procedimento cirúrgico descompressivo	28
6. RESULTADOS	30
6.1 Isolamento celular e criação de banco de células	30
6.2 Ensaio pré-clínico.....	31
6.2.1 Divulgação do projeto e seleção dos animais	31
6.2.2 Terapia celular	31
6.2.3 Avaliação funcional e neurológica.....	33
6.2.4 Exames de ressonância magnética	36
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS.....	51

1. INTRODUÇÃO

De maneira geral, as células-tronco são distinguidas de outros tipos celulares devido a habilidades importantes: são células indiferenciadas, capazes de se proliferar e gerar células-filhas idênticas através da divisão celular, mesmo após um longo período de inatividade; e sob certas condições fisiológicas ou experimentais, em microambientes apropriados, são induzidas a se diferenciar em linhagens celulares especializadas (DOMINICI *et al.*, 2006).

O estudo com células-tronco aposta principalmente no seu potencial regenerativo que, devido a sua alta plasticidade, a torna uma ferramenta promissora na medicina regenerativa (RAMER *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2009;). Vale ressaltar que essa é a mais avançada tecnologia na área da Medicina Veterinária e tem como objetivo a substituição de células ou tecidos injuriados, a fim de restaurar sua função e promover melhor qualidade de vida aos animais, pois reduz a dor e o período de recuperação, além de permitir a modulação do sistema imune e da resposta inflamatória (SAULNIER *et al.*, 2016; ORLANDIN *et al.*, 2017).

As células-tronco mesenquimais derivada da membrana amniótica são células multipotentes, capazes de se diferenciar em vários tipos celulares (NAKAJIMA *et al.*, 2004; VIDANE *et al.*, 2014, CARDOSO *et al.*, 2017), além de apresentarem capacidade de modulação da resposta inflamatória e propriedades imunorreguladoras, o que permite praticável transplantes alogênicos (LANGE-CONSIGLIO *et al.*, 2013; ORLANDIN *et al.*, 2017). O potencial terapêutico dessa linhagem celular na lesão medular vem sendo retratado há mais de uma década (SANKAR *et al.*, 2003; ZHI-YUAN *et al.*, 2006; MENG *et al.*, 2008).

A doença de discos intervertebrais (DDIV), ou hérnia de disco, é uma das causas mais comuns de compressão medular e representam a maior parte dos atendimentos neurológicos na clínica de pequenos animais, sendo responsável pela maioria dos casos de paralisia em cães (SEIM, 1996; TOOMBS, WATERS, 2007; DOWNES *et al.*, 2009; NISHIDA *et al.*, 2012; BRISSON, 2010). Podem ser do tipo I, extrusão; ou tipo II, protusão (HANSEN, 1952), e sua classificação é feita conforme sinais clínicos e neurológicos (OLBY *et al.*, 1994). Atualmente, o tratamento dessa enfermidade é conservador, entretanto, para os animais em estágio mais avançado,

ele se apresenta ineficaz (BEZERRA, 2013). O transplante de células tronco tem sido recentemente identificado como uma potencial modalidade terapêutica para o tratamento do trauma medular (NISHIDA *et al*, 2012; RYU *et al*, 2012).

No presente trabalho, 12 cães paraplégicos, acometidos por hérnia de disco crônica, foram selecionados, mas apenas 8 concluíram o projeto. Foram divididos em três grupos, conforme seu histórico. Além de procedimento descompressivo, os animais receberam três aplicações de células-tronco, e passaram por avaliações quinzenais. Também foram realizados exames de ressonância magnética antes e após o tratamento. Alguns animais apresentaram melhora, mas devido ao pequeno número amostral, os resultados deste trabalho são inconclusivos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste projeto foi avaliar a resposta da terapia celular utilizando células-tronco derivadas da membrana amniótica canina e sua contribuição para a regeneração nervosa e recuperação motora de cães com doenças de disco intervertebral toracolombar crônica de grau V, promovendo melhora na qualidade de vida, através da implantação de um tratamento viável.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar e estabelecer cultivo de células-tronco derivadas de membrana amniótica de cadelas em terço final gestacional;
- ✓ Criação de banco de células;
- ✓ Propor um protocolo de tratamento baseado em associação de procedimento cirúrgico descompressivo e transplante de células-tronco derivadas da membrana amniótica em cães com DDIV crônica;
- ✓ Avaliação funcional dos animais através de Escala Funcional de Olby antes, durante e após o tratamento;
- ✓ Avaliação tecidual através de ressonância magnética, antes e após o tratamento.

3. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

As células-tronco derivadas de membrana amniótica apresentam maior capacidade proliferativa e apresentam alta plasticidade e tendência à pluripotência quando comparada com outras células-tronco mesenquimais. Devido aos seus efeitos imunomodulador, antiinflamatório, e regenerativo espera-se que a terapia celular seja capaz de promover modulação da resposta neuroinflamatória, e consequentemente da cicatriz glial, promovendo melhora funcional e neurológica aos animais.

O grupo de pesquisa já está inserido no cenário da terapia celular como tratamento da lesão medular (FEITOSA, 2011; BOCABELLO, 2013; FEITOSA *et al.*, 2017) e na caracterização e utilização de células-tronco derivadas da membrana amniótica (VIDANE *et al.*, 2014; CARDOSO, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2016; CARDOSO *et al.*, 2017; VIDANE *et al.*, 2017; GOMES, 2017). Além disso, este é o primeiro trabalho na Medicina Veterinária a utilizar células-tronco derivadas da membrana amniótica em cães com lesões medulares crônicas não-iatrogênicas, representando uma grande inovação na área, que pode ser repercutida em outras espécies.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Lesão Medular em cães

As afecções da medula espinhal podem ter origem endógena ou exógena. Fatores exógenos incluem traumas automobilísticos, quedas, lesões por armas de fogo ou provocadas por outros animais e objetos (SHORES *et al.*, 1990; MEINTJES *et al.*, 1996; BAGLEY *et al.*, 1999; PLATT *et al.*, 2005). A lesão de origem endógena geralmente decorre de fraturas patológicas, anormalidades congênitas, instabilidade, neoplasias e extrusão ou protrusão de disco intervertebral, sendo as últimas a representarem maior parte dos atendimentos neurológicos na clínica de pequenos animais (SEIM, 1996; TOOMBS, WATERS, 2007; DOWNES *et al.*, 2009; NISHIDA *et al.*, 2012).

A doença de discos intervertebrais (DDIV) é uma das causas mais comuns de compressão medular e responsável pela maioria dos casos de paralisia em cães. Caracteriza-se pela degeneração do disco intervertebral e uma síndrome neurológica de compressão ou lesão da medula espinhal, que ocorre devido o deslocamento do disco ou partes do mesmo para o canal vertebral, num processo conhecido como herniação (BRISSEON, 2010). As hérnias de disco podem ser classificadas, de acordo com Hansen (1952) em dois tipos: Hansen tipo I, caracterizada pela extrusão do material do núcleo pulposo para dentro do canal vertebral, onde causará uma compressão medular; e Hansen tipo II, resultado de uma deformação do disco, que acarreta em protusão do mesmo para dentro do canal medular.

Segundo Olby *et al.* (1994), a classificação da DDIV conforme sinais clínicos e neurológicos é feita da seguinte maneira:

- Grau I: dor ou hiperestesia, sem alterações neurológicas, dificuldade de deambulação, animal pode vocalizar, apresentar cifose e constipação;
- Grau II: além dos sintomas anteriores, o paciente apresenta ataxia, paraparesia, membros pélvicos com alteração de propriocepção, porém com presença de nocicepção em todos os membros;

- Grau III: mesmas alterações vistas nos graus anteriores, porém, com hiperalgesia toracolombar, acinesia, incontinência ou constipação, incapacidade de sustentação do corpo, porém, com movimento voluntário dos membros pélvicos, alteração de propriocepção, com presença de nocicepção profunda nos quatro membros;
- Grau IV: somado aos sinais anteriores, animal apresenta paraplegia e ausência de movimentos voluntários, porém, ainda há presença de dor profunda dos membros;
- Grau V: todas as características dos demais grupos, com ausência de dor profunda nos membros pélvicos.

Os achados de imagem das discopatias são: calcificação do disco ou núcleo pulposo; redução ou alteração do formato do espaço intervertebral e radiopacidade do forame intervertebral (KEALY & McALLISTER, 2005; THRALL, 2007), resultando em compressão medular e deslocamento da dura-máter (LAMB, 1994; BAGLEY *et al.*, 1996)

Atualmente, o tratamento de eleição para animais acometidos por essas afecções baseia-se em um tratamento conservador, com o uso de fármacos capazes de controlar o edema e dor; aplicação de técnicas cirúrgicas descompressiva (BRAUND, 1996) ou ainda reabilitação. Entretanto, para os graus mais graves, em quase 50% dos casos, esses tratamentos ainda são ineficazes (BEZERRA *et al.*, 2013).

A utilização de células-tronco na terapia regenerativa desperta expectativa positiva. Devido a este fato, diversos modelos experimentais estão sendo testados, tanto a nível molecular como a nível pré-clínico para sanar dúvidas quanto a real eficácia da terapia, sobre possíveis complicações de sua aplicação, e, principalmente sobre o potencial carcinogênico destas células (NISHIDA *et al.*, 2012). Elas apresentam características de células precursoras, podendo ser diferenciadas em diversos tipos celulares e replicação (BYDLOWSKI, 2009). A terapia celular tornou-se, portanto, uma esperança no tratamento de lesões medulares (SARMENTO *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015; HOFFMAN, DOW, 2016; FEITOSA *et al.*, 2017; ESCALHÃO *et al.*, 2017).

4.2 Células-tronco derivadas da membrana amniótica

A placenta desempenha funções primordiais no desenvolvimento embrionário de mamíferos, uma vez que é responsável pela proteção, nutrição e oxigenação dos fetos. É constituída por três membranas: córion, alantóide e âmnio (ARRALLA *et al.*, 2013).

O âmnio é uma fina membrana avascular, composta de uma camada epitelial e uma camada externa de tecido conjuntivo. São células-tronco mesenquimais, pluripotentes, demonstram alta plasticidade e são capazes de se auto-renovar e se diferenciar *in vitro* em linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica (HUO *et al.*, 2010; CREMONESI *et al.*, 2011; URANIO *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2012; LANGE-CONSIGLIO *et al.*, 2012; LANGE-CONSIGLIO *et al.*, 2013; VIDANE *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2017). Apresentam viabilidade celular e manifestam maior capacidade proliferativa quando comparadas com outras células-tronco mesenquimais. Apresentam ainda características antibacterianas, antiinflamatórias, além de auxiliar na reepitelização devido à adesão e migração de células epiteliais basais e restauração do fenótipo epitelial (MOREIRA & OLIVEIRA, 2000; INSAUSTI *et al.*, 2014).

Secretam uma variedade de fatores de crescimento e citocinas, como fator de crescimento epidermal, fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento de queratinócitos, fator de crescimento de fibroblastos, interleucina-8, angiogenina, fator de crescimento semelhante à insulina, além de outros fatores e proteínas responsáveis pela migração, imunossupressão e propriedades anti-inflamatórias (HILL *et al.*, 1993; MCKENNA *et al.*, 1998; FUKCHI *et al.*, 2004; LITWINIUL & GRZELA, 2014; SAULNIER *et al.*, 2016).

Foram realizados testes tumorigênicos em camundongos *Balb/c nude*, sem formação tumoral em 60 dias após a aplicação das células, que demonstraram-se seguras para aplicações neste modelo animal (CARDOSO, 2015). As mesmas células utilizadas neste estudo foram aplicadas em animais com doença renal crônica, e apresentaram-se seguras para aplicação, além de terem sido capazes de melhorar a condição clínica tanto de gatos (VIDANE *et al.* 2017), como em cães (GOMES, 2017).

4.3 Terapia celular na lesão medular

Em um estudo realizado por Sankar *et al.* (2003), testou-se a eficiência de células-tronco derivadas de membrana amniótica de humano quando aplicadas em lesão medular iatrogênica em macacos. Observou-se boa interação das células com o tecido nervoso e significativa remielinização, bem como a sua capacidade de modular a cicatriz glial, porém, não demonstrando melhora clínica até os 60 dias avaliados.

Um estudo parecido, realizado por Zhi-Yuan *et al.* (2006), avaliou a aplicação das mesmas células com aplicação em ratos. Os achados histopatológicos foram semelhantes, exceto pela melhora clínica dos animais, que retornaram à função motora dos membros pélvicos no último estudo.

Ainda nessa linha, Meng *et al.* (2008) confirmou, através de análises eletrofisiológicas e imunohistológicas, o sucesso no co-transplante de células-tronco oriundas de membrana amniótica de ratos com fator de crescimento para fibroblastos e células-tronco de origem neuronal em ratos com lesão medular crônica. Os resultados demonstraram que houve significativa melhora locomotora, além da sobrevivência e diferenciação neuronal, sugerindo que estas fontes podem ser benéficas no tratamento da lesão medular.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Comitê de Ética

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo e aprovado em 18 de maio de 2016, sob protocolo CEUA N. 2274160216.

5.2 Isolamento e cultivo celular

As células-tronco derivadas de membrana amniótica de cadelas foram provenientes de ovarioalpingohisterectomias eletivas, em torno de 50 a 60 dias de gestação. O material foi obtido de clínicas particulares e campanhas de castração. Foi feita uma mensuração da idade dos fetos de acordo com seu tamanho (mensuração da longitude crânio caudal), formação das pálpebras e dígitos, diferenciação de genitália externa e presença de glândulas mamárias, pelos e coxins, conforme Evans & Sack (1973) e Pieri *et al.* (2015).

O protocolo de isolamento e cultivo celular foi adaptado de Soncini *et al.* (2007) e Lange-Consiglio *et al.* (2012). Em um fluxo laminar estéril, a membrana amniótica foi separada dos outros anexos fetais e lavada cuidadosamente com solução PBS estéril, contendo 2% de Penicilina/Estreptomicina¹ e 1% de Anfotericina². Sem realizar maceração mecânica, a membrana inteira foi submetida à pré-digestão em dispase (2,4 U/mL), a 38,5 °C por 9 minutos. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas à 200 x g por 5 minutos. O pellet foi ressuspendido em colagenase 0,1% e incubado a 38,5 °C durante 3 horas. A mistura foi centrifugada à 200 x g durante 10 minutos e seu sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 10mL de α -MEM³, suplementado com 10% de SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina e essa combinação foi passado por filtro⁴ de 100 μ m e

¹ Penicillin Streptomycin – Cat. No. 15140-122 - Gibco® – New York, USA.

² Amphotericin B solution – Cat. No. A2942-50ML – Sigma – São Paulo, Brasil.

³ Minimum Essential Medium Alpha Medium – Cat. No. 11900-024 - Gibco® – New York, USA.

⁴ Cell Strainer 100 μ m – Cat. No. 042703 – SPL Lifescience – Gyeonggi-do, Korea.

plaqueado em garrafas⁵. O material contido no filtro foi recolhido e submetido à ingestão enzimática por tripsina a 38,5 °C durante 2 minutos. O produto da digestão foi centrifugado à 200 x g durante 10 minutos e plaqueado. As garrafas foram incubadas em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂, em atmosfera de 80%. Foi feita a manutenção das células até atingirem cerca de 80% de confluência (análise visual através de microscopia ótica), quando sofreram o repique enzimático.

No processo de repique ou passagem celular, o meio de cultivo foi descartado, foi acrescentada tripsina, previamente aquecida em banho-maria à 38 °C, e a garrafa foi mantida em estufa a 38,5 °C. Após um período de 3 à 5 minutos, o cultivo foi avaliado por microscopia e, quando constatado que não haviam mais células aderidas, as células ressuspensas foram transferido para tubos do tipo falcon de 15mL. Mais meio de cultivo foi acrescentado na garrafa, a fim de realizar uma lavagem para auxiliar na remoção de alguma célula que ainda estivesse aderida e, posteriormente, essa suspensão foi acrescentada ao tubo correspondente à respectiva garrafa. A mistura foi centrifugada à 200 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado e replaqueado – até atingir P2 - ou criopreservado.

5.3 Criação do banco de células

Para criopreservação, as células foram tripsinizadas (citado em item 5.1), ressuspensas em 1mL de meio α MEM, contadas em Câmara de Neubauer e aliqüotadas, de forma que cada criotubo contenha $2,5 \times 10^6$ células, diluídas em 450 μ L de meio DMEM F12, 450 μ L de SFB e 100 μ L de DMSO⁶. O material foi mantido overnight em Mr. Frosty⁷ à -80 °C. Após esse período, transferidas para o botijão de nitrogênio líquido, onde estão armazenadas até a necessidade do uso.

Estas células já foram previamente caracterizadas por Cardoso (2015), onde se provaram seguras para aplicação.

⁵ Cell Culture Flasks, 75 cm² – Cat. No. 658-170 Cellstar® – Greiner Bio-one – Frickenhausen, Germany.

⁶ Dimetilsulfóxido – Cat. No. 1001806610 – Sigma – São Paulo, Brasil.

⁷ Mr. Frosty™ Freezing Container – Cat. No. 5100-0001 – Thermo Scientific™ – New York, USA.

5.4 Ensaio pré-clínico

5.4.1 Divulgação do projeto e seleção dos animais

O projeto foi divulgado em clínicas e hospitais veterinários através de material impresso (Figura 1), e em outras mídias sociais, de forma a atrair tutores voluntariamente. Foi utilizado um vocabulário acessível a eles, por se tratar de um público leigo. Os tutores dos animais selecionados assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, onde foram informados sobre todas as etapas do projeto, bem como seus direitos e deveres.

Figura 1. Material de divulgação impresso.

5.4.2 Delineamento experimental

Foram selecionados 12 cães com DDIV toracolombar crônica V, diagnosticados clinicamente, através de anamnese, exame clínico específico, avaliação funcional e neurológica pela Escala de Olby e exames de ressonância magnética. Quatro destes

cães já foram submetidos à cirurgia previamente, sem recuperação relatada pelos tutores. Os outros oito nunca passaram por procedimentos descompressivo. Os animais que apresentaram outras enfermidades neurológicas ou algum tipo de trauma medular, que não a lesão descrita anteriormente, não foram incluídos no projeto.

Os cães foram distribuídos entre três grupos, conforme Esquema 1:

- n=4: “CT”, onde será realizada aplicação de células-tronco epidural, no dia 0, 15 e 45 dias em animais que já foram submetidos anteriormente à cirurgia descompressiva;
- n=4: “grupo cirurgia + CT”, onde será realizado a aplicação de células-tronco durante procedimento cirúrgico descompressivo e epidural, quinze e quarenta e cinco dias após a descompressão, totalizando 2 aplicações por esta via;
- n=4: “grupo cirurgia + placebo”, onde será feita a aplicação de solução fisiológica nas mesmas condições do grupo anterior.

A distribuição dos animais entre o grupo “cirurgia + placebo” e “cirurgia + CT” ocorrerá de forma aleatória, de modo que as pessoas responsáveis pelo tratamento e os tutores não saberão o que tipo de terapia que foi aplicada, até o término do experimento.

Esquema 1. Delineamento experimental.

Três meses após o tratamento inicial, os exames ressonância magnética realizados inicialmente foram repetidos, a fim de compará-los. Para estes exames, o animal foi previamente anestesiado nas mesmas condições anteriores. Os exames

de avaliação funcional e neurológica, repetidos quinzenalmente, bem como a ressonância magnética, fornecerão resultados qualitativos.

Ao final do experimento, os tutores de cães do “grupo cirurgia + placebo” terão direito a receber o mesmo tratamento oferecido ao “grupo cirurgia + CT”, se assim desejarem. Estes resultados, entretanto, não farão parte dos resultados divulgados neste projeto.

5.4.3 Avaliação funcional e neurológica

Para avaliação dos animais, foi realizada a anamnese detalhada, aferida a temperatura, coloração de mucosa, tempo de preenchimento capilar e frequência cardiorrespiratória.

Figura 2. Avaliação de nocicepção sendo realizada em um dos animais selecionados.

Conforme a Figura 2, os animais passaram por avaliação funcional e neurológica quinzenalmente, onde seus reflexos e capacidades motoras foram pontuadas baseadas na escala desenvolvida por Olby *et al.* (2001), conforme a tabela a seguir:

Tabela 1. Avaliação funcional pela Escala de Olby.

Estágio	Pontuação	Condição neurológica
I	0	Acinesia e ausência de nocicepção
	1	Acinesia e presença de nocicepção
	2	Acinesia pélvica e movimento voluntário da cauda
II	3	Passo sem suporte de peso, com movimento de apenas uma articulação
	4	Passo sem suporte de peso, com mais de uma articulação envolvida em menos de 50% do tempo
	5	Passo sem suporte de peso, com mais de uma articulação envolvida em mais de 50% do tempo
III	6	Protração com suporte de peso, menos de 10% do tempo
	7	Protração com suporte de peso, 10 a 50% do tempo
	8	Protração com suporte de peso, mais que 50% do tempo
IV	9	Protração com suporte de peso em 100% do tempo, com hipotonia pélvica (erros superiores à 90% do tempo)
	10	Protração com suporte de peso em 100% do tempo, com hipotonia pélvica (erros em 50 a 90% do tempo)
	11	Protração com suporte de peso em 100% do tempo, com hipotonia pélvica (erros inferiores à 50% do tempo)
V	12	Ataxia pélvica com normotonia (erros superiores à 50% do tempo)
	13	Ataxia pélvica com normotonia (erros inferiores à 50% do tempo)
	14	Marcha sem alterações

(OLBY *et al.*, 2001)

5.4.4 Exames de ressonância magnética

Para a realização da ressonância magnética, animais foram previamente anestesiados e submetidos à intubação orotraqueal. Após receber a medicação pré-anestésica condizente com cada animal, a indução anestésica foi realizada com propofol, na dose de 6mg/kg/EV, seguida de manutenção com isoflurano. Os animais foram mantidos em fluidoterapia com solução fisiológica e monitorados durante todo o procedimento através de capnografia, oximetria de pulso, monitoração invasiva de pressão arterial e frequência cardiorrespiratória em monitor de eletrocardiograma.

Figura 3. Sala de Ressonância Magnética (A) e animal posicionado durante exame (B).

Os animais foram posicionados em decúbito lateral no equipamento⁸ (Figura 3). Cada exame durou cerca de 2 horas, onde foram realizadas as sequências de imagem Sagital Fast Spin Echo T2 (FSE T2), Sagital Spin Echo T1 (SE T1), Sagital Fast Flair, Sagital Stir, Transversal Fast Spin Echo T2 (FSE T2), Sagital Gradiente Echo T2 (GE T2) e Transversal Spin Echo T1 (SE T1) quando houver a necessidade de aplicação de contraste. Nas sequências sagitais, o *Field of View* (FOV) foi de cerca de 24 cm, com cortes de 3 milímetros de espessura e 0 espaço; enquanto que nas sequências transversais, o FOV foi de aproximadamente 20 cm, com cortes de 4 milímetros e 0 espaço.

5.4.5 Preparo das células-tronco e terapia celular

Dois criotubos aleatórios foram retirados do nitrogênio líquido e mantidos em banho-maria a cerca de 37 °C durante 2 minutos. O conteúdo foi transferido para tubo tipo falcon de 15 mL, acrescido de 1 mL de solução fisiológica e centrifugado a 200 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuscitado em 1mL de solução fisiológica e novamente centrifugado a 200 x g por 5 minutos. O pellet resultante do procedimento foi ressuscitado em 1 mL de solução fisiológica. 10 µL da suspensão final foram homogeneizados com 10 µL do corante azul de

⁸ Vet-MR Grande XP – Esaote S.p.A. - Florence, Italy.

tripano e contados em Câmara de Neubauer. A média de células viáveis dos dois criotubos após a lavagem e ressuspensão em seringa foi de $1,93 \times 10^6$ células.

Previamente às aplicações, foi realizado o protocolo de lavagem conforme descrito acima. O conteúdo foi aspirado em seringa de insulina⁹ de 1mL e inoculado nos animais tratados, conforme protocolo de Feitosa (2011).

No “grupo CT”, onde os animais já foram submetidos à cirurgia descompressiva prévia, imediatamente após a ressonância, os animais receberam a colocação de cateteres epidurais¹⁰ no espaço lombossacral. A confirmação do espaço da agulha de Tuohy¹¹ foi realizada através dos testes de “perda de resistência” e “gota pendente”. O cateter foi preenchido com solução fisiológica e introduzido até o local da lesão, onde foram injetadas as células-tronco, conforme observado na Figura 4.

Figura 4. Colocação de cateter epidural (A) e aplicação de células-tronco (B).

Nos animais que foram submetidos à cirurgia, do “grupo cirurgia + CT”, a primeira aplicação foi realizada por gotejamento sobre a lesão, durante o procedimento, seguida de duas aplicações epidurais, quinze e quarenta e cinco dias após a descompressão cirúrgica. Em cães do “grupo cirurgia + placebo”, foi aplicado somente 1 mL de solução fisiológica, nas mesmas condições que o grupo anterior.

⁹ Seringas de Insulina BD Ultra-Fine™ - BD© – New Jersey, USA.

¹⁰ Epidural Minipack Clear Catheter, 3 lateral eyes – Smiths Medical ASD, Inc. – Keene, USA.

¹¹ Agulha Peridural BD™ Tuohy - BD© – New Jersey, USA.

Nestes, as aplicações foram realizadas no espaço intervertebral entre L7-S1, conforme mostra a Figura 5.

Figura 5. Confirmação de espaço lombossacral através do teste de gota pendente (A). Aplicação epidural solução (B).

5.4.6 Procedimento cirúrgico descompressivo

Foram seguidos os protocolos padrões de analgesia e anestesia para realização de técnica cirúrgica e recuperação pós-operatória.

Em todos os animais dos grupos “cirurgia + placebo” e “cirurgia + CT”, foi realizado o procedimento de hemilaminectomia, pois é a técnica mais utilizada em casos de síndromes toracolombares, uma vez que está associada com melhores resultados de descompressão da medula e remoção do material extrudado, além de apresentar maiores taxas de recuperação neurológica pós-operatório, menores riscos de formação de fibrose, além de menores taxas de instabilidade mecânica (BRISON, 2010).

O procedimento cirúrgico (Figura 6) baseou-se na retirada da lâmina lateral e dorsolateral, dos pedículos e das facetas articulares (FOSSUM, 2007). Ao realizar-se o acesso, a medula espinhal foi dissecada, a fim de haver uma boa visualização dos nervos e vasos, possibilitando a retirada delicada e segura apenas do material extrudado, evitando manipulação da medula (TOOMBS; BAUER, 1998).

Figura 6. Exposição das raízes nervosas durante procedimento de hemilaminectomia.

Após o procedimento, os animais permaneceram em observação até a recuperação anestésica e a seguir receberam alta médica acompanhada de prescrição antiinflamatória e analgésica de uso oral. A recuperação pós-operatória foi acompanhada a distancia e após 15 dias, os animais retornaram para a retirada dos pontos e segunda aplicação de solução.

6. RESULTADOS

6.1 Isolamento celular e criação de banco de células

Todas as células-tronco utilizadas no presente trabalho foram obtidas de uma única cadela, num total de seis fetos, todos em estágio final gestacional. Foi realizada a dissecação da membrana amniótica, conforme observado na Figura 7.

Figura 7. Feto em terço final gestacional, envolto pela membrana amniótica.

As células foram criopreservadas na segunda passagem (conforme figura 8), totalizando 52 criotubos, que permaneceram em nitrogênio líquido até o momento do uso.

Figura 8. Células-tronco derivadas da membrana amniótica com cerca de 80-90% de confluência e características “mesenchymal-like”.

6.2 Ensaio pré-clínico

6.2.1 Divulgação do projeto e seleção dos animais

No período de maio a julho de 2016, mais de 200 tutores de cães paraplégicos se inscreveram para participar voluntariamente do projeto. Uma pré-triagem foi realizada, através de histórico e envio de exames anteriores. Destes, mais de 40 foram selecionados para a etapa de avaliação funcional e neurológica. Doze animais foram selecionados, de acordo com a similaridade de sinais clínicos e local da lesão.

Dos doze animais selecionados, quatro cães desistiram ou foram eliminados do projeto. Portanto, oito cães selecionados concluíram o protocolo proposto (conforme Tabela 2), sendo 4 machos e 4 fêmeas, de raças mistas, pequeno porte, com paraplegia e ausência de dor profunda secundária à hérnia de disco toracolumbar. O animal mais velho apresenta 10, e o mais novo 3 anos de idade. Todos apresentavam paraplegia há, em média, 1 ano e 4 meses anos no momento da seleção.

Tabela 2. Animais que concluíram o projeto.

Animal	Sexo	Raça	Idade	Local de origem	Grupo
Sininho	F	Dachshund	7a	São Paulo	CT
Whisky	M	Shih-Tzu	3a	São Paulo	
Tail	M	SRD	5a	Campinas	
Lessie	F	Dachshund	10a	Campinas	
Mel	F	SRD	7a	Bertioga	Cirurgia + CT
Totó	M	Poodle	7a	São Paulo	
Mel	F	Dachshund	10a	Sorocaba	Cirurgia + placebo
Bruno	M	Dachshund	10a	São Paulo	

6.2.2 Terapia celular

Todos os animais submetidos à cirurgia e/ou aplicação de células-tronco apresentam bem, sem efeitos adversos, presença de tumores ou piora do quadro. Entretanto, algumas queixas dos tutores serão relatadas a seguir:

- Uma das tutoras notou inchaço nos olhos de seu animal após a alta médica. Entretanto, a mesma relatou que em outro procedimento cirúrgico, o mesmo já havia apresentado reação alérgica, o que nos fez concluir que edema ocular possivelmente ocorreu devido ao uso de algum fármaco utilizado na anestesia. Após este episódio, entretanto, os animais foram submetidos a um maior tempo de observação pós-aplicação.
- Após 4 dias da cirurgia, um dos cães foi submetido à uma enucleação devido à uma grave úlcera. O mesmo apresentava distrofia e degeneração da córnea há 4 anos. Após este procedimento, o animal continuou o tratamento estipulado pelo projeto e passa bem.
- A última paciente submetida à cirurgia sofreu uma hemorragia muito grave, necessitando de transfusão de sangue (Figura 9) e internação hospitalar para observação, mas recuperou-se bem.

Figura 9. Transfusão de sangue sendo realizada em paciente após hemorragia durante hemilaminectomia.

6.2.3 Avaliação funcional e neurológica

A princípio, os animais seriam avaliados quinzenalmente. Entretanto, a maioria dos tutores não compareceu nas datas agendadas, portanto, alguns animais foram avaliados a cada duas ou três semanas. Tal perda de padrão não foi prejudicial, pois mesmo após um período mais prolongado, os resultados permaneciam os mesmos das avaliações anteriores.

Os quatro animais do “grupo CT” inicialmente apresentavam score 0, segundo a escala de Olby. Conforme ilustrado no gráfico abaixo, um dos animais evoluiu para score 8, uma vez que readquiriu o reflexo da dor profunda e foi capaz de realizar a protração com suporte de peso em mais de 50% do tempo, enquanto animal 2 apresentou movimento voluntário da cauda, conforme mostra o Gráfico 1.

Gráfico 1. Avaliação do “grupo CT”

Conforme observado no Gráfico 2, um dos animais submetido à cirurgia e terapia celular não apresentou melhora alguma.

Gráfico 2. Avaliação do “grupo cirurgia + CT”

O outro animal apresentou melhora significativa. O mesmo consegue colocar-se em estação para se alimentar e dar alguns passos voluntários quando sustentado, conforme Figura 10, mesmo sem nocipeção. O mesmo foi encaminhado para fisioterapia após o projeto e vem apresentando progresso desde então.

Figura 10. Um dos animais do "grupo cirurgia + CT", em estação.

Dentre os animais que receberam a solução placebo após o procedimento cirúrgico, nenhuma melhora neurológica conforme Escala de Olby foi notada, como podemos observar no Gráfico 3. Entretanto, um dos animais passou a se arrastar de forma diferente, apresentado escaras em lugares onde não haviam anteriormente. Os tutores deste cão ainda relataram que o mesmo passou a “avisar” quando havia necessidade de urinar.

Gráfico 3. Avaliação do "grupo cirurgia + placebo"

6.2.4 Exames de ressonância magnética

Nos exames de ressonância magnética do grupo que já havia sido submetido ao procedimento cirúrgico previamente (Figura 11), foi possível observar áreas hipo e hiperintensas por permeio dos tecidos moles dorsais, sugestivos da cicatriz cirúrgica; e perda da intensidade de sinais do núcleo pulposos dos discos intervertebrais, sugerindo desidratação e degeneração discal. Em algum dos animais, ainda foi possível observar perda da definição da coluna ventral do líquido e deslocamento dorsal da medula espinhal adjacente, característico de protusão discal, mesmo após procedimento descompressivo anterior. Não houve nenhuma alteração nas imagens realizadas após o D90 neste grupo.

Figura 11. Ressonância magnética evidenciando área de sinal hipointenso e degeneração discal nos cortes sagital (A) e transversal (B).

Em todos os animais que foram submetidos ao procedimento descompressivo, foi observado artefato de imagem compatível com metal, conforme Figura 12. Possivelmente, tal imagem resultou de limalhas derivadas do desgaste da fresa cirúrgica em contato com o Descolador Freer, utilizado para afastar e proteger a medula durante o desgaste ósseo. Devido a isso, as imagens tornam-se inapropriadas para laudo médico.

Figura 12. Ressonância Magnética pós-operatória, evidenciando artefato de imagem.

7. DISCUSSÃO

As células-tronco são muito visadas devido ao seu potencial regenerativo, que a torna um possível recurso na terapia regenerativa, inclusive em transplantes xenogênicos (SANKAR *et al.*, 2003; MITSUI *et al.*, 2003; ZHI-YUAN *et al.*, 2006; MENG *et al.*, 2008; BONNER *et al.*, 2010; YAZDANI *et al.*, 2012; YAMADA *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2015; DO-THI *et al.*, 2016; JIN *et al.*, 2016; FEITOSA *et al.*, 2017), graças as suas propriedades imunomoduladoras, que também são trunfos terapêuticos (ORLANDIN *et al.*, 2017). Vem demonstrando resultados promissores em diversas espécies e patologias medulares (SARMENTO *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015; HOFFMAN, DOW, 2016; FEITOSA *et al.*, 2017; ESCALHÃO *et al.*, 2017).

As células-tronco da membrana amniótica são de fácil obtenção, cultivo, expansão e utilização (WENCESLAU *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2012) e envolvem pouca preocupação ética – uma vez que trata-se de um material que será descartado –, além de ser possível a ampliação desta pesquisa também para a espécie humana. Apresentam bons resultados quando utilizadas no tratamento de doença renal crônica (VIDANE *et al.*, 2017; GOMES, 2017), infertilidade (FOUAD *et al.*, 2016), lesões oftálmicas (KIM *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2006), queimaduras e fúrias dermatológicas (SALEHI *et al.*, 2015, ELHENEIDY, *et al.*, 2016), osteoartrites (VINES *et al.*, 2016), fascites e tendinites (WERBER, 2015), lesões ligamentares (WATTS *et al.*, 2011; LANGE-CONSIGLIO *et al.*, 2013) e nervosas (SU *et al.*, 2018). Entretanto, este tipo celular ainda é pouco explorado em tratamento de lesões medulares em cães (SANKAR *et al.*, 2003; ZHI-YUAN *et al.*, 2006; MENG *et al.*, 2008), sendo nosso trabalho o primeiro a utilizá-lo em cães com doença de disco intervertebral crônica, não iatrogênica.

Já foi descrito, anteriormente, o potencial tumorigênico destas células (LIMA *et al.*, 2009). Entretanto, a linhagem já havia sido caracterizada anteriormente, comprovando-se segura para aplicação *in vivo* (WINCK, 2012; CARDOSO, 2015, GOMES, 2017). Os animais do presente trabalho foram acompanhados, mesmo após o período de 90 dias. Até o presente momento, a terapia celular mostrou-se factível, sem efeitos adversos.

A hemilaminectomia foi o procedimento de eleição, uma vez que preserva a integridade mecânica e estrutural da coluna, é menos traumática, reduz chances de formação de cicatrizes que recidiva na compressão medular, além do acesso ao disco ser melhor e a fenestração realizada de maneira é mais fácil. (SHARP, WHEELER, 1999; SEIM, 2007).

A fenestração do disco afetado, bem como os anteriores e posteriores à ele ainda é uma discussão entre autores e cirurgiões. Enquanto uns consideram a prática apropriada, pois permite a retirada de resquícios do material extrudado no espaço intervertebral e a prevenção da recidiva do quadro (KNAPP *et al.* 1990, FINGEROTH, 1995, BRISSON, 2004; MAYHEW, 2004; FORTERRE, 2008), outros a consideram desnecessária, uma vez que a taxa de recorrência de herniação em animais que não foram submetidos à fenestração é rara, de menos de 5% (SEIM, 2007). Dentre os animais que já haviam sofrido procedimento descompressivo – nenhum submetido à fenestração discal – dois apresentaram melhoras significativas. Entretanto, foi possível observar nos exames de ressonância magnética que ainda havia sinais de compressão, o que pode ter comprometido a melhora destes.

Dentre os animais que receberam a solução placebo, nenhum apresentou melhora. Entretanto, um dos animais do “grupo CT” apresentou melhora após seis meses do término do projeto, portanto, ainda há a possibilidade de observarmos melhora nos demais animais. Mesmo alguns trabalhos não apresentando grandes melhoras nos exames de imagem (FEITOSA *et al.*, 2017), esperávamos observar alguma alteração na ressonância pós-cirúrgica, mas devido à técnica utilizada para desgaste ósseo isso não foi possível.

Infelizmente, muitos profissionais ainda acreditam que a descompressão deve ocorrer até no máximo 48 horas após a perda da nocicepção. Tal crença já caiu por terra com estudos como os de Scott e McKee (1999), Olby *et al.* (2003), Kazakos *et al.* (2005) e Arias *et al.* (2007). Um dos animais que recebeu a solução de células-tronco após a cirurgia apresentou melhora. Entretanto, não podemos considerar se esta melhora foi devido ao procedimento descompressivo, à terapia celular ou a combinação de ambos devido ao pequeno valor amostral.

Animais com lesão crônica, além da cicatriz glial, que é uma barreira anatômica para a regeneração nervosa (OLSON, 2002), também apresentam

evidentes déficits musculares. Os animais que apresentaram melhora neurológica poderiam ter recuperado a movimentação voluntária se houvesse associação de fisioterapia e exercícios para ganho de massa muscular (BENNAIM *et al.*, 2017).

A maior dificuldade encontrada no projeto foi a administração do teste multicêntrico. A maioria dos animais morava há mais de 300 km de distância e era necessário orquestrar a agenda dos tutores, da equipe de anestesia, do cirurgião e da própria agenda do hospital veterinário, além do deslocamento para realização das ressonâncias em Botucatu, o qual também envolvia uma série de agendas que precisava estar em sincronia. Outrossim, a realização de um teste duplo-cego implica em um equipe responsável pela preparação das soluções em sigilo, fazendo-se necessário muita confiança entre o grupo de trabalho.

Infelizmente, mesmo após a seleção bastante rigorosa, alguns tutores optaram por desistir do projeto, por diversos motivos. Isso nos deixou com uma amostra ainda menor. Entretanto, devido aos altos custos dos exames e procedimentos envolvidos no projeto, não seria possível atingirmos um *n* necessário para que os resultados fossem estatisticamente significativos. Portanto, há a necessidade de mais estudos para que se comprove que a terapia é, de fato, funcional. Mesmo em estudos randomizados realizados em estruturas exemplares e pesquisadores experientes, conseguimos o não-alcance do *n* desejado: No estudo de Lim *et al.* (2014), apenas 13 dos 19 cães concluíram o projeto; na pesquisa de Tsai *et al.* (2015), 36 dos 40; e na de Olby *et al.* (2016), 94 de 150 cães.

Nenhum artigo da literatura consultada mostra alta médica após aplicação. Ponto este bastante positivo do nosso experimento, com disponibilidade do tratamento pós-operatório domiciliar após a descompressão. Tal condição só foi possível graças à um primoroso procedimento cirúrgico e um excepcional controle analgésico. Os tutores comprometeram-se a medicar os animais, os quais estavam muito mais confortáveis e seguros em suas casas.

Contudo, havendo esclarecimento aos tutores quanto aos riscos, chances e benefícios envolvidos com a terapia, mesmo havendo animais que não apresentaram melhoras, vale a pena buscar esse tipo de terapia alternativa na tentativa de, ao menos, promover bem-estar a estes animais.

8. CONCLUSÕES

Obtivemos sucesso ao estabelecer um cultivo de células-tronco derivadas de membrana amniótica de cadelas em terço final gestacional, bem como a criação do banco de células;

O protocolo associando cirurgia descompressiva e transplante destas células em cães com DDIV toracolombar crônica se mostrou factível, sendo possível observar melhora neurológica em alguns animais após o tratamento, como a capacidade de se manter em estação e o retorno da nocicepção.

Não foi possível analisar a melhora tecidual através de ressonância magnética, uma vez que a cirurgia resultou em artefatos de imagens que não permitiram sua avaliação.

Apesar de bastante laborioso, a realização do teste duplo cego garantiu fidedignidade às avaliações e resultados obtidos que, mesmo com um número amostral pequeno, gerou frutos satisfatórios para a equipe e os tutores.

REFERÊNCIAS

- ALISAUSKAITE N, SPITZBARTH I, BAUMGARTNER W, DZIALLAS P, KRAMER S, DENING R, STEIN VM, TIPOLD A. Chronic post-traumatic intramedullary lesions in dogs, translational model. 12(11): pp: e0187746. 2017.
- ARALLA, M.; GROPPETTI, D.; CALDARINI, L.; CREMONESI, F.; ARRIGHI, S.; Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. *Research in Veterinary Science*, v.95, p. 15-22, 2013.
- ARIAS, MVB; NISHIOKA, CM; GARCIA, CO; REIA, AZ; BARAÚNA JÚNIOR, D; MARCASSO, RA. Avaliação dos resultados clínicos após cirurgia descompressiva em cães com doença de disco intervertebral. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.6, p.1445-1450, 2007.
- BAGLEY, R .S.; HARRINGTON, M L.; SILVER, G. M.; CAMBRIDGE, A. J.; CONNORS, R. L.; MOORE, M. P. Exogenous spinal trauma: clinical assessment and initial management. *Compendium Continuing Education Veterinary*, v. 21, p.1138-1144, 1999.
- BAGLEY, R.S. TUCKER, R., HARRINGTON, M. L.. Lateral and foraminal disk extrusion in dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.18, n.7, p.795-804, 1996.
- BENNAIM M, PORATO M, JARLETON A, HAMON M, CARROLL JD, GOMMEREN K, BALLIGAND M. Preliminary evaluation of the effects of photobiomodulation therapy and physical rehabilitation on early postoperative recovery of dogs undergoing hemilaminectomy for treatment of thoracolumbar intervertebral disk disease. *Am J of Vet Res*; 78(2):195–206. 2017.
- BEZERRA, C.H.; LOPES, R.S.; FRANCO, A.; SILVA, L.L.C.; DATTELKREMER, T.P.; TOYOFUKU, L.; CARAMICO, M.; TUSSINI, P. Levantamento de casos de discopatias toracolombares tratados com fisioterapia veterinária. *Anais do XI Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais*, p.70, 2013.
- BOCABELLO, RZ. O uso de condroitinase ABC combinada com células-tronco do epitélio olfatório de coelhos em modelo de lesão medular por hemissecção dorsal em coelhos. *Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo*. São Paulo, 2013.
- BONNER JF, BLESCH A, NEUHUBER B, FISCHER I. Promoting directional axon growth from neural progenitors grafted into the injured spinal cord. *J Neurosci Res.*,88(6):1182-92, 2010.

- BRAUND, K.G.; Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais. 2.ed. Cap. 129, p.1104-1998. São Paulo: Manole, 1996.
- BRISSON, B. A.; MOFFATT, S. L.; SWAYNE, S. L.; PARENT, J. M. Recurrence of thoracolumbar intervertebral disk extrusion in chondrodystrophic dogs after surgical decompression with or without prophylactic fenestration: 265 cases (1995-1999). *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 224, n. 11, p. 1808-1814, 2004.
- BRISSON, B.A. Intervertebral Disc Disease in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Maryland Heights, v.40, n.5, p.829-858, 2010.
- BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Ver Bras Hematol Hemoter*, v.31, supl.1, 2009.
- CARDOSO, M.T. Comparação molecular entre células-tronco de membrana amniótica de cão e de gato. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2015.
- CARDOSO MT, PINHEIRO A.O., VIDANE A.S, CASALS J.B., OLIVEIRA V.C, GONÇALVES N.J.N, MARTINS D.S. AMBRÓSIO C.E. Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 2017.
- CHEN, HC; TAN, HY; HSIAO, CH; HUANG, SC; LIN, KK; MA, DH. Amniotic membrane transplantation for persistent corneal ulcers and perforations in acute fungal keratitis. *Cornea*, 25(5): 564-72, 2006.
- CHO, S.R.; KIM, Y.R.; KANG, H.S.; YIM, S.H.; PARK, C.I.; MIN, Y.H.; LEE, B.H.; SHIN, J.C.; LIM, J.B. Functional recovery after the transplantation of neutrally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplant*. 18(12):1359-1368; 2009.
- CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: Progress and perspectives. *Theriogenology*, 75 (8), p.1400-1415, 2011.
- CURATI WL, KINGSLEY DPE, KENDALL BE, MOSELEY IF. MRI in chronic spinal cord trauma. *Neuroradiology*. 35(1), 30–35.1992.
- DOMINICI, M; LE BLANC, K.MUELLER, I; SLAPER-CORTENBACH, I; MARINI, F; KRAUSE, D; DEANS, R; KEATING, A; PROCKOP, DI; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Chytotherapy*, 8(4):315-7, 2006.
- DO-THI A, PERRIN FE, DESCLAUX M, SAILLOUR P, AMAR L, PRIVAT A, MALLET J. Combination of grafted Schwann cells and lentiviral-mediated prevention of glial

- scar formation improve recovery of spinal cord injured rats. *J Chem Neuroanat*, 76:48-60, 2016.
- DOWNES, C. J.; GEMMIL, T. J.; GIBBONS, S. E.; MCKEE. Hemilaminectomy and vertebral stabilisation for the treatment of thoracolumbar disc protrusion in 28 dogs. *Journal of small animal practice*, v.50, p.525-535, 2009.
- ELHENEIDY, H; OMRAN, E; HALWAGY, A; AL-LNANY, H; AL-ANSARY, M; GAD, A. *Int J Womens Health*, 8:225-231, 2016.
- ESCALHÃO CCM, RAMOS IP, HOCHMANMENDEZ C, BRUNSWICK THK, SOUZA SAL, GUTFILEN B, DOS SANTOS GOLDENBERG RC, COELHO SAMPAIO T. Safety of Allogenic Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Intraspinal Transplantation in Dogs with Chronic Spinal Cord Injury. *Stem Cell Int*, 2017.
- EVANS, H.E.; SACK, W.O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. *Anat. Histol. Embryol.* 2:11-45, 1973.
- FEITOSA, M. L. T. Terapia celular com células tronco em coelhos com lesão medular induzida e em cães com lesão medular crônica espontânea. 2011.118f. Tese (Doutorado em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- FEITOSA, MLT; SARMENTO, CAP; BOCABELLO, RZ; BELTRÃO-BRAGA, PCB; PIGNATARI, GC; GIGLIO, RF; MIGLINO, MA; ORLANDIN, JR; AMBRÓSIO, CE. Transplantation of human immature dental pulp stem cell in dogs with chronic spinal cord injury. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 32, p. 540-549, 2017.
- FERNANDES, R.A.; WENCESLAU, C.V.; REGINATO, A.L.; KERKIS, I.; MIGLINO, M.A. Derivation and characterization of progenitor stem cells from canine allantois and amniotic fluids at the third trimester of gestation. *Placenta*, v 33(8), p. 640-644. 2012.
- FINGEROTH, J.M. Treatment of canine intervertebral disk disease. Recommendations and controversies. In: BONAGURA, J.D. *KIRK's Current veterinary therapy XII*. Philadelphia: Saunders, p.1146-53. 1995.
- FOUAD H; SABRY D; ELSETOHY K; FATHY N. Therapeutic efficacy of amniotic membrane stem cells and adipose tissue stem cells in rats with chemically induced ovarian failure. *J Advanced Research* 7(2): 233-241, 2016.
- FORTERRE, F., KONAR, M., SPRENG, D., JAGGY, A., LANG, J. Influence of Intervertebral Disc Fenestration at the Herniation Site in Association with Hemilaminectomy on Recurrence in Chondrodystrophic Dogs with Thoracolumbar Disc Disease: A Prospective MRI Study. *Veterinary Surgery*, 37(4), 399–405. 2008.

- FOSSUM, T.W. Small Animal Surgery, 3rd ed. Elsevier, 2007. 1610 p. 2007.
- GOMES, IS. Teste pré-clínico em doença renal crônica canina, com o uso de células-tronco amnióticas. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2017.
- HANSEN, H.J. A Pathologic-anatomical study on disc degeneration in dog, with special reference to the so-called enchondrosis intervertebralis. *Acta Orthopaedica Scandinavica Suppl.11*, 1-117, 1952.
- HILL, D.J.; CLEMMONS, D.R.; RILEY, S.C.; BASSETT, N.; CHALLIS, J.R. Immunohistochemical ocalization of insulin-like growth factors (OGFs) ang IGF binding proteins-1, -2, -3 in human placenta and fetal membranes. *Placenta*, 14, 1-12, 1993.
- HOFFMAN AM, DOW SW. Concise Review: Stem Cells Trials Using Companion Animal Disease Models. *Stem Cells*, 34-7, 2016.
- HUO, S.; SHI, P.; PANG, X. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells. *Chinese Medical Sciences Journal*, v.25, n.4, p. 211-214. 2010.
- INSAUSTI, C.L.; BLANQUER, M.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, A.M.; CASTELLANOS, G.; MORALEDA, J.M. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. v 7, P.53–63. 2014
- JIN Y, BOUYER J, SHUMSKY JS, HAAS C, FISCHER I. Transplantation of neural progenitor cells in chronic spinal cord injury. *Neurosci Oxford.*, 320:69-82, 2016.
- KAZAKOS, G.; POLIZOPOULOU, Z.S.; PATSIKAS, M.N. et al. Duration and severity of clinical signs as prognostic indicators in 30 dogs with thoracolumbar disk disease after surgical decompression. *J. Vet. Med.*, v.52, p.147-152, 2005.
- KIM, JS; KIM, JC; HAHN, TW; PARK, WC. Amniotc membrane transplantation in infectious corneal ulcer. *Cornea* 20(7):720-6, 2001.
- KEALY, J.K.; McALLISTER, H. O crânio e a coluna vertebral. *Radiologia e ultrassonografia do cão e do gato*. 3.ed. Barueri: Manole, 2005. Cap.5, p 379-391.
- KNAPP, D.P.; POPE, E.R.; HEWETT, J.E. et al. A retrospective study of thoracolumbar disk fenestration in dogs using a ventral approach: 160 cases (1976 to 1986). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.26, p.543-549, 1990.
- LAMB, C.R. Common difficulties whit myelographic diagnosis of acute intervertebral disc prolapsed in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, v.35, n.11, p.549-558, 1994.

- LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI, B.; BIZZARO, D.; MAGATTI, M.; RESSEL, L.; TASSAN, S.; PAROLINI, O.; CREMONESI, F. Characterization and potencial applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. *J Tissue Eng Regen Med*, 6:622-35, 2012.
- LANGE-CONSIGLIO, A.; TASSAN, S.; CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; PEREGO, R.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Investigating the efficacy of amnion-derived compared with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in equine tendon and ligaments injuries. *Cytotherapy*, 15 (8): 1011-20, 2013.
- LEE SH, KIM Y, RHEW D, KUK M, KIM M, KIM WH, KWEON OK. Effect of the combination of mesenchymal stromal cells and chondroitinase ABC on chronic spinal cord injury. *Cytotherapy*, 17(10). 2015.
- LIMA, EB; WINCK, CP; WENCESLAU, CV; GONÇALVES, LG; FERNANDES, IR; HAN, SW; AMBROSIO, CE; MIGLINO, MA; BRAGA, PCB. Stem Cells Derived From Amniotic Membrane may be not a good candidate do cellular therapy. In: 17 Annual Meeting – International Society for Stem Cell Research, Barcelona, 2009.
- LIM, JH; MUGUET-CHANOIT, AC; SMITH, DT; LABER, E; OLBY, NJ. Potassium Channel Antagonists 4-aminopyridine and the T-Butyl Carbamate derivative of 4-aminopyridine improve hind limb function in chronically non-ambulatory dogs; a blinded, placebo-controlled trial. *PLoS One* 9(12): e116139. 2014.
- LITWINIUK, M.; GRZELA, T. Amniotic membrane: new concept for and old dressing. *Wound Repair Regen*, 22, 451-456, 2014.
- McKENNA, D.S.; SAMUELS, P.; ZIMMERMAN, P.D.; KNISS, D.A. Interleukin-1 alpha, epidermal growth factor, and transforming growth factor-beta exhibit differential kinetic on endothelin-1 synthesis in amnion cells. *Journal of Soc Gynecol investing*, 5, 25-30, 1998.
- MEINTJES, E.; HOSGOOD, G.; DANILOFF, J. Pharmaceutic treatment of acute spinal cord trauma. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, Princeton, v.18, n. 6, p. 625-635, 1996.
- MENG, X. T.; LI, C.; DONG, Z. Y.; LIU, J. M.; LI, W.; LIU, Y.; XUE, H.; CHEN, D. Co-transplantation of bFGF-expressing amniotic epithelial cells and neural stem cells promotes functional recovery in spinal cord-injured rats. *Cell Biology International*, v.32, p.1546-1558, 2008.
- MITSUI T, KAKIZAKI H, TANAKA H, SHIBATA T, MATSUOKA I, KOYANAGI T. Immortalized neural stem cells transplanted into the injured spinal cord promote recovery of voiding function in the rat. *J Urol.*, 170:1421-5, 2003.
- MOREIRA, H; OLIVEIRA, C.S. Transplante de membrana amniótica. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v.63, n.4, p. 303-305. 2000.

- NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI, K. Human Placenta derived cells have mesenchymal stem/ progenitor cell potential. *Stem Cells*. v.22, p. 649-658, 2004.
- NISHIDA, H.; NAKAYAMA, M; TANAKA, H.; KITAMURA, M.; SUGIURA, K.; HARADA, Y.; SUKUZI, Y.; IDE, C.; INABA, T. Safety of autologous bone marrow stromal cell transplantation in dogs with acute spinal Cord injury. *Veterinary surgery*, v.41, p.437-442, 2012.
- OLBY, NJ; DYCE, J; HOULTON, JEF. Correlation of plain radiographic and lumbar myelographic findings with surgical findings in thoracolumbar disc disease. *Journal os Small Animal Practice, Gloucestershire*, v.35, n.7, 9.345-350, 1994.
- OLBY, NJ; DE RISIO, L; MUÑANA, KR; WOSAR, MA; SKEEN, TM; SHARP, NJ; KEENE, BW. Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. *Am J Vet Res*. Oct, 62 (10): 1624-8, 2001.
- OLBY, NJ; LEVINE, J; HARRIS, T; MUÑANA, K; SKEEN, T; SHARP, N. Long term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.222, p.762-769, 2003.
- OLBY, NJ; VADEN, SL; WILLIAMS, K; GRIFFITH, EH; HARIS, T; MARIANI, CL; MUNANA, KR; EARLY, PJ; PLATT, SR; BOOZER, L; GIOVANELLA, C; LONGSHORE, R. Effect of cranberry extract on the frequency of bacteriuria in dogs with acute thoracolumbar disk herniation: a randomized controlled clinical trial. *J Vet Intern Med*. 31(1): 60–68. 2016.
- OLSON, L. Medicine: clearing a path for nerve growth. *Nature*;416(6881):589-90, 2002.
- ORLANDIN, JR; AMBRÓSIO, CE; LARA, VM. Glial scar-modulation as therapeutic tool in spinal cord injury in animal models. *Acta Cirúrgica Brasileira (Online)*, v. 32, p. 168-174, 2017.
- PARK, S; SEO, M; KIM, H; KANG, K. Isolation and Characterization of Canine Amniotic Membrane-Derived Multipotent Stem Cells. *PLoS ONE* 7(9): e44693. 2012.
- PIERI, N; SOUZA, AF; CASALS, JB; ROBALLO, K; AMBROSIO, CE; MARTINS, DS. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. *Reprod Domest Anim*, 50(4): 625-31. 2015.
- PINHEIRO, A.O.; CARDOSO, MT.; VIDANE, A.S.; CASALS, J.B.; PASSARELLI, D.; ALENCAR, A.L.F.; SOUSA, R.L.M.; FANTINATO-NETO, P.; OLIVEIRA, V.C.; LARA, V.M ; AMBRÓSIO, C.E. Controversial results of therapy with mesenchymal stem cells in the acute phase of canine distemper disease. *Genet. and Mol. Res*. V 15 (2), 2016.

- PLATT, S. R.; ABRAMSON, C. J.; GAROSI, L. S. Administering corticosteroids in neurologic diseases. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, Princeton, v.27, n.3, p.210-220, 2005.
- RAMER, M.S.; PRIESTLEY, J.V.; McMAHON, S.B. Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature* 403, 312-316. 2000.
- RYU HH; KANG BJ; PARK SS; KIM Y; SUNG GJ; WOO HM; KM WM; KWEON OK. Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly and umbilical Cord blood for treating spinal Cord injuries in dogs. *J Vet Med Sci*, 74(12) 1617-30, 2012.
- SALEHI, SH; ASADI, K; MOUSAVI, SJ; SHOAR, S. Evaluation of amniotic membrane effectiveness in skin graft donor site dressing in burn patients. *Indian J Surg*, 77(2): 427-431, 2015.
- SANKAR, V.; MUTHUSAMY, R. Letter to neuroscience role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience*, v.118, p.11-17, 2003.
- SARMENTO CA, RODRIGUES MN, BOCABELLO RZ MESS AM, MIGLINO MA. Pilot Study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal Cord injury. *Regen Med Res* 2(1), 2014.
- SAULNIER, N.; LORIAUA, J.; FEBREA, M.; ROBERT, C.; RAKIC, R.; BONTE, T.; BUFF, S.; MADDENS, S. Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.171, p. 47–55. 2016.
- SCOTT, H.W.; McKEE, W.M. Laminectomy for 34 dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception. *J. Small Anim. Pract.*, v.40, p.417-422, 1999.
- SEIM, H.B. Conditions of the thoracolumbar spine. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim)*, v.4, p. 235-253, 1996.
- SEIM, HB. Surgery of the Thoracolumbar Spine. In: FOSSUM. *Small Animal Surgery*. 3rd Ed. St Louis: Mosby Elsevier, p.1460-1492. 2007.
- SHARP, NJH; WHEELER, SJ. Thoracolumbar disc disease. *Small animal spinal disorders*. Edinburg: Elsevier Mosby, 379p. 2005.
- SHORES, A.; BRAUND, K. G.; BRAWNER, W. R. Management of acute spinal cord trauma. *Veterinary Medicine*, Chicago, v.85, p.724-739, 1990.

- SONCINI, M.; VERTUA, E.; GIBELLI, L.; ZORZI, F.; DENEGRİ, M.; ALBERTINI, A.; WENGLER, G.S.; PAROLINI, O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Med*, 1:296-305, 2007.
- SU, CF; CHANG, LH; KAO, CY; LEE, DC; CHO, KH; KUO, LW; CHANG, H; WANG, YH; CHIU, IM. Application of amniotic fluid stem cells in repairing sciatic nerve injury in minipigs. *Brain Research*, 1678: 397-406, 2018.
- THRALL, D.E. Textbook veterinary diagnostic radiology 5.ed. Philadelphia: Saunders. Chap.12, p.194, 2007.
- TOOMBS, J.P.; BAUER, M.S. Afecção do disco intervertebral. In: Slatter - Manual de cirurgia de pequenos animais. 2 ed. São Paulo, 1998, v.1, cap.75, p.1286-1305.
- TOOMBS, J.P; WATERS, D.J. Afecções do disco intervertebral. In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais, vol. 1, ed. 3, cap.80, Barueri, SP: Manole, p. 1193-1209, 2007.
- TSAI LC, LIN YW, HSIEH CL. Effects of Bee Venom Injections at Acupoints on Neurologic Dysfunction induced by thoracolumbar intervertebral disc disorders in canine: A randomized, controlled prospective study. *Biomed Res Int*. pp: 363801, 2015.
- URANIO, M.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; L'ABBATE, AL.L.; CATACCHIO, C.R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Isolation, Proliferation, Cytogenetic and Molecular Characterization and In Vitro Differentiation Potency of Canine Stem Cells From Foetal Adnexa: A comparative Study of Amniotic Fluid, Amnion and Umbilical Cord Matriz. *Molecular Reproduction & Development*, 78:361-373, 2011.
- VIDANE, A.S.; SOUZA, A.F.; SAMPAIO, R.V.; BRESSAN, F.F.; PIERI, N.C.; MARTINS, D.S.; MEIRELLES, F.V.; MIGLINO, M.A.; AMBROSIO, C.E. Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 2014, v.7, p.71-78.
- VIDANE, AS; PINHEIRO, AO; CASALS, JB; PASSARELLI, D; HAGE, MCFNS; BUENO, RS; MARTINS, DS; AMBRÓSIO, CE. Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. *Reprod in Domest Anim*. 52:316-326. 2017.
- VINES, JB; ALIPRANTIS, AO; GOMOLL, AH; FARR, J. Cryopreserved Amniotic suspension for the treatment of knee osteoarthritis. *J Knee Surg*, 29(6): 443-450, 2016.
- WATTS, A.E.; YEAGER, A.E.; KOPYOV, O.V. NIXON, A.J. Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem Cell Research & Therapy*, v.2:4. 2011.

- WERBER, B. Amniotic tissues for the treatment of chronic plantar fasciosis and Achilles tendinosis. *J Sports Med*, p219896, 2015.
- WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver and bone marrow. *Tissue Engineering Part A*, v.17, p. 2165-2176. 2011.
- WINCK, CP. Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica canina em diferentes estágios gestacionais. 2012, 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- YAMADA H, ITO D, OKI Y, KITAGAWA M, MATSUMOTO T, WATARI T, KANO K. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells promotes locomotor functional recovery by remyelination and glial scar reduction after spinal cord injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun.*, 454 (2):341-6, 2014.
- YAZDANI SO, PEDRAM M, HAFIZI M, KABIRI M, SOLEIMANI M, DEHGHAN M-M, JAHANZAD I, GHEISARI Y, HASHEMI SM. A comparison between neurally induced bone marrow derived mesenchymal stem cells and olfactory ensheathing glial cells to repair spinal cord injuries in rat. *Tissue Cell.*, 44(4):205-13, 2012.
- ZHI-YUAN, W.; GUO-ZHEN, H.; YI, L.; XIN, W.; LI-HE, G. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury. *Chinese Medical Journal*, 119: 2101-2107. 2006.
- ZHU Y, SODERBLOM C, KRISHNAN V, ASHBAUGH J, BETHEA JR, LEE JK. Hematogenous macrophage depletion reduces the fibrotic scar and increases axonal growth after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.*, 74:114-25, 2015.

ANEXOS

1. Certificado de Aprovação pelo Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Padronização de protocolo para tratamento de lesão medular crônica em cães utilizando terapia celular", protocolado sob o CEUA nº 2274160216, sob a responsabilidade de **Jéssica Rodrigues Orlandin** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP em reunião de 18/05/2016.

We certify that the proposal "Standardization of protocol for chronic spinal cord injury treatment in dogs using cell therapy", utilizing 10 Dogs (males and females), protocol number CEUA 2274160216, under the responsibility of **Jéssica Rodrigues Orlandin** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law 11.794, of October 8, 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering of São Paulo University in the meeting of 05/18/2016.

Vigência da Proposta: de 02/2016 a 01/2018

Área: **Medicina Veterinária**

Procedência: **Não aplicável**

Espécie: **Cães**

Gênero: **Machos e Fêmeas**

Idade: **misto**

N: **10**

Linhagem: **misto**

Peso: **misto**

Nota: As doenças de disco intervertebrais (DDIV) representam a maior parte de atendimentos neurológicos e são responsáveis pela maioria dos casos de paralisia em cães. Os tratamentos utilizados atualmente não demonstram resultados satisfatórios em pacientes com manifestações neurológicas mais graves, como graus IV e V. A fim de promover recuperação nervosa e motora, além de melhora na qualidade de vida, o presente trabalho objetiva criar um protocolo, através de um ensaio duplo cego, associando cirurgia descompressiva, reabilitação e terapia celular em cães com lesão medular crônica. Optou-se por utilizar células-tronco derivadas da membrana amniótica de cadelas em tempo médio da gestação, devido ao seu alto potencial proliferativo e tendência à pluripotência. Os animais serão submetidos a procedimento cirúrgico descompressivo e divididos em dois grupos: grupo controle, o qual receberá apenas PBS; e grupo experimental, que receberá a terapia celular. A aplicação tópica das soluções será durante o procedimento cirúrgico e, após quinze e quarenta e cinco dias, serão realizadas outras duas aplicações via intratecal. Também será prescrito um protocolo fisioterápico, a fim de promover a reabilitação motora. Os animais passarão por acompanhamento quinzenal e serão reavaliados três meses após o procedimento cirúrgico, para quantificação da melhora, através de exames funcionais, ressonância magnética e quantificação de Neurotrofina-3 canina, representando uma grande inovação nas pesquisas sobre esta doença em cães.

Pirassununga, 18 de maio de 2016

Irineu dos Santos Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Universidade de São Paulo

2. Logo do Projeto Passear de Novo, desenvolvido por Felipe Godinho Page

3. Comunicado de aceitação no projeto

Comunicado Oficial

A Equipe Passear de Novo tem o prazer de informar que a cadelinha

foi selecionada e convidada à juntar-se ao nosso projeto.

Esperamos poder, em breve, passear de novo com vocês!

Atenciosamente,
Jéssica R. Orlandin
Médica Veterinária - Mestranda em Biociência Animal

4. Orientações referentes à Ressonância Magnética

Instruções para ressonância magnética

A Equipe Passear de Novo gostaria de repassar alguns lembretes:

_____ tem um exame de ressonância magnética agendado no dia __/__/____, às ____:____, na Unesp de Botucatu.

O endereço é: Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Correra, s/n - Bairro Rubião Junior, Botucatu - SP, 18618-970.

O jejum deve ser de **12 horas**. Água pode dar à vontade!

O cãozinho deverá abrir uma ficha no Hospital da Universidade, portanto, recomenda-se a chegada com **uma hora** de antecedência.

Os exames serão custeados pelo projeto, sendo os papais responsáveis apenas pelo transporte.

Quaisquer dúvidas, estamos à disposição.

Abraço e até logo!

Jéssica R. Orlandin

Médica Veterinária - Mestranda em Biociência Animal
(19) 97134-9237 - jessica.vet@usp.br

5. Cartão de Natal

6. Certificado de Mérito Científico